

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR  
SEROTONINA EM CORPO CAVERNOSO DE RATO**

**LUIGI MARINS BERRETTA**

**Florianópolis  
2014**



Luigi Marins Berretta

**CARACTERIZAÇÃO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR  
SEROTONINA EM CORPO CAVERNOSO DE RATO**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Áurea  
Elizabeth Linder

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Berretta, Luigi

CARACTERIZAÇÃO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR SEROTONINA EM  
CORPO CAVERNOSO DE RATO / Luigi Berretta ; orientador,  
Áurea Elizabeth Linder - Florianópolis, SC, 2014.  
119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Serotonina. 3. Corpo cavernoso. 4.  
taquifilaxia. 5. disfunção erétil. I. Linder, Áurea  
Elizabeth. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Luigi Marins Berretta

## **CARACTERIZAÇÃO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR SEROTONINA EM CORPO CAVERNOSO DE RATO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thereza Christina Monteiro de Lima (Coordenadora do  
Curso)

### **Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Áurea Elizabeth Linder (Orientadora / FMC / CCB/ UFSC)

---

Prof. Dr. André Sampaio Pupo (FMC / ICB / UNESP)

---

Prof. Dr. José Marino Neto (CFS / CCB / UFSC)

---

Prof. Dr. Giles Alexander Rae (FMC / CCB / UFSC)

---

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (FMC / CCB / UFSC)

Florianópolis, 21 de março de 2014.



"A maioria dos homens não quer nadar antes que o possa fazer." Não é engraçado? Naturalmente, não querem nadar. Nasceram para andar na terra e não para a água. E, naturalmente, não querem pensar: foram criados para viver e não para pensar! Isto mesmo! E quem pensa, quem faz do pensamento sua principal atividade, pode chegar muito longe com isso, mas sem dúvida estará confundindo a terra com a água e um dia morrerá afogado.

O lobo da estepe - Hermann Hesse





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Helio e Eliane, pelo apoio incondicional nas minhas escolhas.

À minha orientadora, Dra. Àurea Elizabeth Linder, que ao longo dos últimos dois anos me guiou no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Professor Dr. José Eduardo da Silva Santos pelas diversas contribuições intelectuais e discussões acerca deste trabalho.

Aos Professores Dr. Giles Alexander Rae, Dr. José Marino Neto e Dr. Anicleto Poli por disponibilizarem equipamentos e fármacos fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas e amigos que de alguma forma participaram dessa jornada.

Aos demais Professores, técnicos e servidores que contribuem para o Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Ao apoio financeiro da FAPESC, CNPQ e PPG-FMC.

RESUMO

---

**BERRETTA, L. M. “Caracterização da contração induzida por serotonina em corpo cavernoso de rato.”** 2014. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

A disfunção erétil pode ser definida como a dificuldade parcial ou total de se obter e/ou manter a ereção peniana para um desempenho sexual satisfatório. Para que a ereção peniana ocorra, há necessidade de aumento do fluxo sanguíneo para o pênis por relaxamento de seu tecido erétil, o corpo cavernoso. Além disso, é preciso que o retorno venoso do pênis diminua para que a ereção se mantenha, processo que conta com a participação da veia dorsal peniana. O papel da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) para a ereção peniana não está bem estabelecido, apesar de crescer o uso de fármacos que alteram sua homeostasia, como a fluoxetina. Além disso, estudos em nosso laboratório demonstraram a capacidade do corpo cavernoso (CC) em captar a 5-HT e metabolizá-la em 5-HIAA, seu principal metabólito. Outros trabalhos mostraram que, após ser captada pela célula vascular, a 5-HT é capaz de modular a contração do músculo liso por um mecanismo denominado serotonilação. Deste modo e sabendo preliminarmente da capacidade do CC de rato contrair na presença da 5-HT, o objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar farmacologicamente essa resposta. Na análise de contrações neurogênicas do CC por estímulo elétrico de campo, observamos que o principal neurotransmissor liberado no CC de rato capaz de contraí-lo é a noradrenalina, a qual contrai o CC por ativação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Esses dados sugerem pouca ou nenhuma liberação neuronal de 5-HT. Apesar disso, observamos que a 5-HT exógena é capaz de gerar uma resposta contrátil não reprodutível em CC de rato, sugerindo a existência de taquifilaxia. No entanto, não foi observada resposta taquifilática na veia dorsal peniana exposta à 5-HT 10  $\mu$ M. Utilizando a metil- $\beta$ -ciclodextrina, um tensoativo capaz de sequestrar colesterol causando um desarranjo de estruturas de membrana como as cavéolas, verificamos que a resposta taquifilática não ocorreu através da internalização de receptores pelas caveolas. Além disso, verificamos que a inibição do metabolismo da 5-HT com o uso de pargilina, bem como a inibição da captação de 5-HT com o uso de fluoxetina, não alteraram o perfil da resposta contrátil induzida por 5-HT. Além disso, o metabólito da 5-HT, o 5-HIAA foi incapaz de gerar uma resposta contrátil. Esses dados sugerem ser improvável que a 5-HT intracelular seja importante no processo de contração do CC de rato. Com o uso de agonistas dos

tipos de receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> e de antagonistas dos tipos de dos receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, demonstramos que receptores 5-HT<sub>2</sub> e, mais especificamente os do subtipo 5-HT<sub>2A</sub>, sejam os principais responsáveis por gerar a contração observada no CC de rato. Podemos concluir que a ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> pela 5-HT em CC de ratos induz uma resposta contrátil que sofre dessensibilização com exposições repetidas à amina, fenômeno não observado na veia dorsal peniana. Desta forma, por não manter seu efeito contrátil no CC, e por contrair a veia dorsal peniana, a 5-HT pode contribuir para a função erétil em ratos.

**Palavras-chave:** Serotonina. Corpo Cavernoso. Taquifilaxia.



ABSTRACT

---

**BERRETTA, L. M. “Characterization of serotonin-induced contraction in rat corpus cavernosum.”** 2014. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Erectile dysfunction is defined as the inability to obtain and/or maintain an erection for satisfactory sexual performance. Penile erection occurs by the increase in blood flow into the penis in parallel with the relaxation of the corpus cavernosum (CC), its erectile tissue. Furthermore, a decrease in venous return from the penis is also necessary to maintain erection, a process that involves the participation of the dorsal penile vein. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in penile erection is not well established despite the increasing use of drugs that alter its homeostasis, such as fluoxetine. Moreover, data from our laboratory show the ability of the CC to take up 5-HT and metabolize it into its major metabolite, 5-HIAA. Other studies have shown that after 5-HT uptake by the vascular smooth muscle cell, it is able to modulate smooth muscle contraction intracellularly by a mechanism called serotonylation. In light of these aspects, and knowing preliminarily the contractile ability of 5-HT, the purpose of this study was to characterize pharmacologically the contractile response of the rat CC to 5-HT. By evaluating neurogenic contractions induced by electrical field stimulation, we observed that norepinephrine is the main contractile neurotransmitter released in the rat CC, acting via stimulation of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. These data suggest nerves in the CC release little or no 5-HT. Nevertheless, we observed that exogenous 5-HT is able to induce a non-reproducible contractile response in the rat CC, suggesting tachyphylaxis. However, this tachyphylactic response to 5-HT was not observed in the dorsal penile vein. Using methyl- $\beta$ -cyclodextrin, a drug that depletes cholesterol from the cell membrane and causes a disruption of caveolae structures, we found that the tachyphylactic response does not occur through 5-HT receptor internalization via caveolae. Furthermore, we found that the inhibition of 5-HT metabolism by pargyline, as well the inhibition of 5-HT uptake by fluoxetine did not alter the profile of the contractile response induced by 5-HT. Moreover, 5-HIAA was unable to produce a contractile response. These data suggest that intracellular 5-HT is unlikely important to contraction of the rat CC. Using agonists of the 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> families of 5-HT receptors and antagonists of the 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> families of 5-HT receptors, we observed that the 5-HT<sub>2</sub> receptors, more specifically the 5-HT<sub>2A</sub>, are the main responsible



for the contraction induced by 5-HT in the rat CC. We conclude that the activation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor by 5-HT induces a tachyphylactic contractile response in the CC, but not in the dorsal penile vein. This inability of 5-HT to maintain a sustained contraction of the CC, allied to its ability to contract the penile dorsal vein, suggest it may contribute to erectile function in rats.

**Keywords:** Serotonin. Corpus Cavernosum. Tachyphylaxis.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estruturas penianas.....	2
<b>Figura 2</b> - Estrutura anatômica do corpo cavernoso de humano.....	3
<b>Figura 3</b> - Hemodinâmica da ereção em um esquema de pênis humano.....	5
<b>Figura 4</b> - Esquema da ereção psicogênica gerada através da interação de diversos estímulos.....	7
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de contração de uma célula muscular lisa responsável por manter o estado flácido do pênis.....	9
<b>Figura 6</b> - Síntese e metabolismo da 5-HT.....	13
<b>Figura 7</b> - A produção de 5-HT em uma célula enterocromafim.....	15
<b>Figura 8</b> - O ciclo da 5-HT: da origem até o sangue periférico.....	16
<b>Figura 9</b> - Sistema para órgão isolado.....	28
<b>Figura 10</b> - Haste para fixação do corpo cavernoso.....	29
<b>Figura 11</b> - Curva concentração-resposta cumulativa (CCRC) para 5-HT e fenilefrina em corpo cavernoso de rato .....	39
<b>Figura 12</b> -Resposta contrátil de tiras de corpo cavernoso de rato isoladas à estimulação elétrica de campo (EEC).....	41
<b>Figura 13</b> - Avaliação da resposta contrátil induzida por 5-HT e fenilefrina na presença de prazosina em corpo cavernoso de rato.....	42
<b>Figura 14</b> - Reprodutibilidade da resposta contrátil em corpo cavernoso de rato quando estimulados com 5-HT (100 $\mu$ M), fenilefrina (10 $\mu$ M) e KCl (80 mM) (A) e um registro típico da estimulação por 4 vezes com 5-HT seguida de estimulação com fenilefrina (B).....	44
<b>Figura 15</b> - Reprodutibilidade da resposta contrátil da veia dorsal peniana de rato a adições repetidas de 5-HT (100 $\mu$ M) e fenilefrina (10 $\mu$ M).....	45
<b>Figura 16</b> - Comparação da contração obtida em corpo cavernoso de rato quando estimulado com 5-HT ou fenilefrina uma única vez (E1; 100 $\mu$ M) com a contração obtida, em mesma concentração, na curva concentração-resposta cumulativa.....	47
<b>Figura 17</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de M $\beta$ CD.....	48
<b>Figura 18</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de pargilina em corpo cavernoso de rato.....	50
<b>Figura 19</b> - Avaliação da resposta contrátil induzida por 5-HT na presença e na ausência de pargilina em corpo cavernoso de rato.....	51
<b>Figura 20</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e presença de fluoxetina em corpo cavernoso de rato.....	52
<b>Figura 21</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de ketanserina.....	54
<b>Figura 22</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de LY 266097.....	55

<b>Figura 23</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência presença de SB 269970.....	57
<b>Figura 24</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de zacopride.....	58
<b>Figura 25</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de WAY 100135.....	59
<b>Figura 26</b> - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de GR 127935.....	60



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Composição da solução salina fisiológica (SFF).....	26
<b>Quadro 2</b> - Lista de agonistas utilizados na caracterização farmacológica de subtipos de receptores serotoninérgicos.....	33
<b>Quadro 3</b> - Lista de antagonistas utilizados na caracterização farmacológica de subtipos de receptores serotoninérgicos.....	34



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de M $\beta$ CD em CC de rato.....	49
<b>Tabela 2</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de pargilina em CC de rato.....	50
<b>Tabela 3</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de fluoxetina em CC de rato.....	52
<b>Tabela 4</b> - Resposta contrátil induzida por agonistas serotoninérgicos em CC de rato .....	53
<b>Tabela 5</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de ketanserina em CC de rato.....	54
<b>Tabela 6</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de LY 266097 em CC de rato.....	56
<b>Tabela 7</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de SB 269970 em CC de rato.....	57
<b>Tabela 8</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de zacopride em CC de rato.....	58
<b>Tabela 9</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de WAY 100135 em CC de rato.....	59
<b>Tabela 10</b> - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de GR 127935 em CC de rato.....	60

## LISTA DE ABREVIACÕES

5-HIAA	-	Ácido 5-hidroxindolacético
5-HT	-	5-hidroxitriptamina; serotonina
5-HTP	-	5-hidroxitriptofano
AADC	-	Aminoácido aromático descarboxilase
ADH	-	Aldeído desidrogenase
ANOVA	-	Análise de variância
CC	-	Corpo cavernoso
CCRC	-	Curva concentração-resposta cumulativa
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	-	Dióxido de carbono
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAG	-	Diacilglicerol
DAT	-	Transportador de dopamina
DE	-	Disfunção erétil
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
E1	-	Estímulo único ou primeiro estímulo
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEC	-	Estímulo elétrico de campo
eNOS/NOS III	-	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	-	Erro padrão da média
FE	-	fenilefrina
g	-	Unidade de medida grama
GC	-	Guanilil ciclase
GMPc	-	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GPCR	-	Receptor acoplado à proteína G
Hz	-	Unidade de medida hertz
IP	-	Via intraperitoneal
IP <sub>3</sub>	-	Trifosfato de inositol
ISRS	-	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
KCl	-	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	Fosfato de potássio monobásico
L	-	Unidade de medida litro
L-NAME	-	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-arginina metil ester
mg	-	Unidade de medida miligrama
mL	-	Unidade de medida mililitro
M	-	Unidade de concentração molar
MAO	-	Monoamina oxidase
MβCD	-	Metil-β-ciclodextrina
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	Sulfato de magnésio heptahidratado
MLC	-	Cadeia leve de Miosina
MLCK	-	Quinase da cadeia leve da miosina

mM	-	Unidade de concentração milimolar
$\mu$ M	-	Unidade de concentração micromolar
n	-	Número de amostras utilizadas
NA	-	Noradrenalina
NaCl	-	Cloreto de sódio
$\text{NaHCO}_3$	-	Bicarbonato de sódio
NANC	-	Não-adrenérgico não-colinérgico
nM	-	Unidade de concentração nanomolar
NE	-	Noradrenalina
NET	-	Transportador de noradrenalina
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
nNOS/NOS I	-	Óxido nítrico sintase neuronal
$\text{O}_2$	-	Gás oxigênio
PDE-5	-	Fosfodiesterase-5
$\text{PIP}_2$	-	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKG	-	Proteína quinase G
PLC- $\beta$	-	Fosfolipase C $\beta$
SERT	-	Transportador de serotonina
SNC	-	Sistema nervoso central
SSF	-	Solução salina fisiológica
TPH	-	Triptofano hidroxilase
V	-	Unidade de medida Volt
VDP	-	Veia dorsal peniana
VIP	-	Peptídeo intestinal vasoativo
VMAT	-	Transportador vesicular de monoaminas



## SUMÁRIO

---

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 FUNÇÃO ERÉTIL .....	2
1.1.1 Anatomia do pênis .....	2
1.1.2 Estrutura do corpo cavernoso.....	3
1.1.3 Hemodinâmica da ereção e o controle do tônus muscular.....	4
1.1.4 Fisiologia da função erétil e os mediadores envolvidos.....	6
1.1.5 Mecanismos de contração.....	8
1.1.6 Mecanismos de relaxamento.....	10
1.1.7 Disfunção erétil.....	10
1.2 5-HIDROXITRIPTAMINA .....	11
1.2.1 Biossíntese, transporte, captação e biotransformação .....	12
1.2.2 Receptores para a 5-HT .....	17
1.2.3 Alteração no tônus da musculatura lisa induzida por 5-HT .....	18
1.2.4 O controle do tônus muscular pela 5-HT independente de receptor.....	19
1.2.5 A serotonina e a função erétil .....	19
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Animais .....	26
3.1 Coleta e preparo dos tecidos .....	26
3.3 Procedimentos experimentais .....	27
3.3.1 Montagem e preparo dos tecidos em cubas de órgão isolado para medidas de tensão isométrica .....	27
3.3.2 Avaliação da contração induzida por 5-HT em corpo cavernoso de rato.....	29
3.3.3 Avaliação da liberação neuronal de transmissores contráteis em corpo cavernoso de rato.....	29
3.3.4 Avaliação da reprodutibilidade do perfil contrátil do corpo cavernoso e veia dorsal peniana frente a agentes contráteis.....	30
3.3.5 Participação das caveolas na resposta taquifilática induzida por 5-HT .....	31
3.3.6 Influência da captação e metabolismo da 5-HT na resposta contrátil em corpo cavernoso de rato .....	31
3.3.7 Caracterização farmacológica dos receptores serotoninérgicos envolvidos na contração do corpo cavernoso de rato.....	32
3.4 Análise estatística.....	35
3.5 Compostos e reagentes.....	35
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Avaliação da contração induzida por 5-HT em corpo cavernoso de rato.....	38
4.2 Avaliação da liberação de transmissores contráteis em corpo cavernoso de rato.....	40



4.3 Avaliação da reprodutibilidade do perfil contrátil do corpo cavernoso e da veia dorsal peniana a agentes contráteis.....	42
4.4 Participação das caveolas na resposta taquifilática induzida por 5-HT.....	48
4.5 Influência da captação e do metabolismo da 5-HT na resposta contrátil do corpo cavernoso de rato .....	49
4.6 Caracterização farmacológica dos receptores serotoninérgicos envolvidos na contração do corpo cavernoso de rato.....	53
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
5.1 O papel da 5-HT e da noradrenalina na contração do corpo cavernoso de rato .....	62
5.2 A contração do corpo cavernoso de rato induzida por 5-HT.....	64
5.3 A captação e o metabolismo da 5-HT na resposta contrátil .....	69
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>



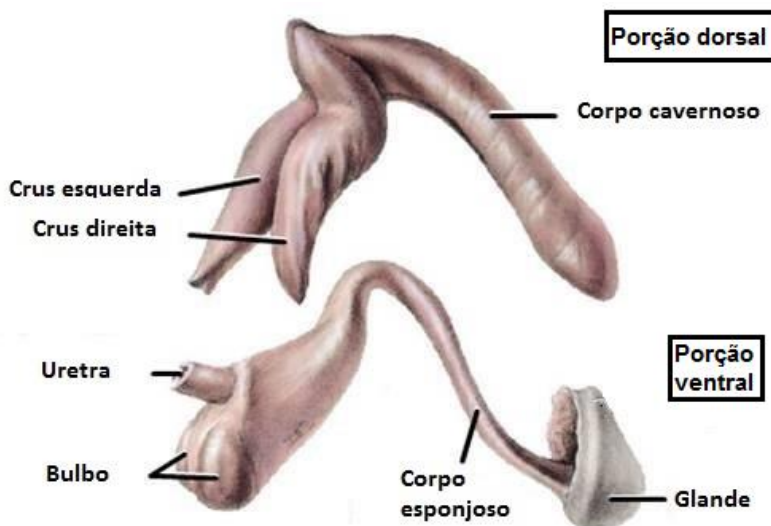
# INTRODUÇÃO

---

## 1.1 FUNÇÃO ERÉTIL

### 1.1.1 Anatomia do pênis

A estrutura geral do pênis é comum entre os mamíferos (Hull, Wood e McKenna, 2006) . Anatomicamente, o pênis pode ser dividido em 3 partes: a base, o corpo e a glande. A base é formada por um par de crus e um bulbo (**FIGURA 1**) e está ligada ao osso da pelve. Na maioria das espécies, o par de crus, encontra-se inserido ao ramo púbico do ísquio originando o corpo cavernoso (CC), também em número par, mas interligados entre si. O bulbo, contendo a uretra, atravessa o diafragma urogenital entre as crus e então se estreita para formar o corpo esponjoso, localizado na porção inferior e ventral do pênis, e termina se expandindo novamente dando origem à glande, dentro da qual o CC termina (Eardley e Sethia, 2003; Hull *et al.*, 2006).

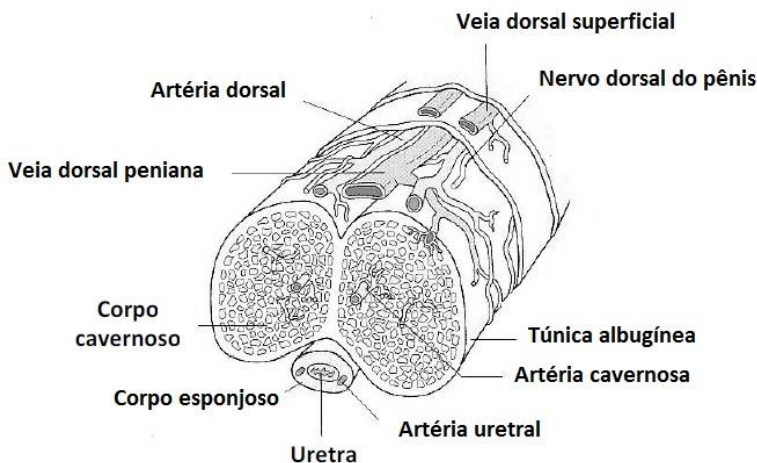


**Figura 1 - Estruturas penianas.** A porção dorsal e a porção ventral juntas formam o pênis. A figura representa o pênis humano. Traduzido e adaptado de Eardley e Sethia, 2003.

### 1.1.2 Estrutura do corpo cavernoso

O CC (**FIGURA 2**) de mamíferos é constituído principalmente por feixes de fibras musculares lisas, elásticas e colágenas que formam sinusóides (trabéculas)(Hull *et al.*, 2006). Os sinusóides se dispõem de modo tortuoso, formando, entre eles, espaços vasculares delineados por células endoteliais, cujo aspecto se assemelha a cavernas (Goyal *et al.*, 2005). Esses sinusóides funcionam como reservatórios preenchidos por sangue, o qual chega através das artérias helicoidais (ramificações originadas da artéria peniana profunda), e têm um papel fundamental na ereção peniana (Bivalacqua *et al.*, 2000).

O retorno venoso se dá por meio do plexo venoso subalbugíneo, o qual se conecta à veia dorsal peniana (VDP) devolvendo o sangue à circulação sistêmica. As fibras colágenas ainda formam a túnica albugínea, uma estrutura que recobre o corpo cavernoso, mas que, junto dele, possui capacidade de se expandir durante a tumescência (Eardley e Sethia, 2003; Goyal *et al.*, 2005).



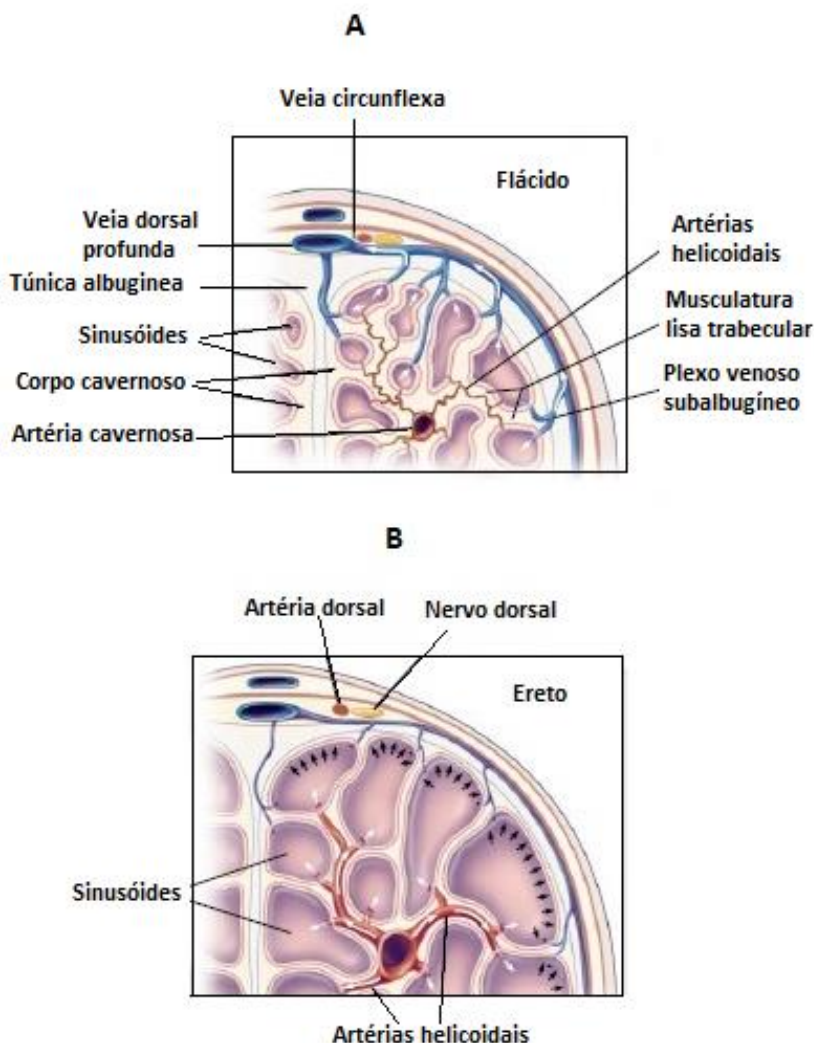
**Figura 2 - Estrutura anatômica do corpo cavernoso de humano.** Traduzido e adaptado de Eardley e Sethia, 2003.

### 1.1.3 Hemodinâmica da ereção e o controle do tônus muscular

Em mamíferos como o homem, macaco, cachorro, gato e roedores, a ereção envolve um processo de alargamento e enrijecimento do pênis (Hull *et al.*, 2006), sendo esse um fenômeno essencialmente vascular. A expansão dos sinusóides e o seu preenchimento com sangue depende do influxo de sangue através das artérias, bem como da diminuição do retorno venoso (**FIGURA 3**).

Para a manutenção do estado flácido do pênis, impulsos nervosos contraem suas artérias e a musculatura lisa do CC. O resultado disso é a diminuição do influxo de sangue para o pênis. Importante ressaltar que nesse caso, o retorno venoso, ocorre normalmente (**FIGURA 3A**).

Durante a ereção, impulsos nervosos promovem o relaxamento das artérias, principalmente as helicoidais, e da musculatura lisa do CC, aumentando o fluxo sanguíneo para o pênis. Com a dilatação do CC, diversas veias, como o plexo venoso subalbugíneo e a própria VDP, são mecanicamente comprimidas, impedindo o retorno de sangue para o corpo, fenômeno denominado veno-oclusão. A veno-oclusão é ainda um dos principais mecanismos responsáveis por manter a ereção (**FIGURA 3B**) (Lue, 2000; Hull *et al.*, 2006; Awad *et al.*, 2011). Além da veno-oclusão, De Lima e Silva (2013) demonstrou que certas substâncias, como a 5-HT, são capazes de gerar contração (vasoconstricção) da VDP, auxiliando na diminuição do retorno venoso. Deste modo, fica evidente que para ocorrer a ereção de modo satisfatório, vários fatores interligados podem ser necessários: a dilatação da musculatura lisa do corpo cavernoso e das artérias com consequente aumento do fluxo sanguíneo para o pênis, a constricção de veias e a veno-oclusão, a integridade dos mecanismos neuronais locais, como dos feixes nervosos.



**Figura 3 - Hemodinâmica da ereção em um esquema de pênis humano.** A) No pênis flácido, os sinosóides e artérias encontram-se contraídos em relação ao painel inferior com fluxo sanguíneo diminuído; o retorno venoso ocorre naturalmente. B) No pênis ereto, as artérias encontram-se dilatadas, bem como os sinosóides. A dilatação dessas estruturas *per se*, comprimem as veias (veno-oclusão) impedindo o retorno venoso. Outras substâncias também atuam nas

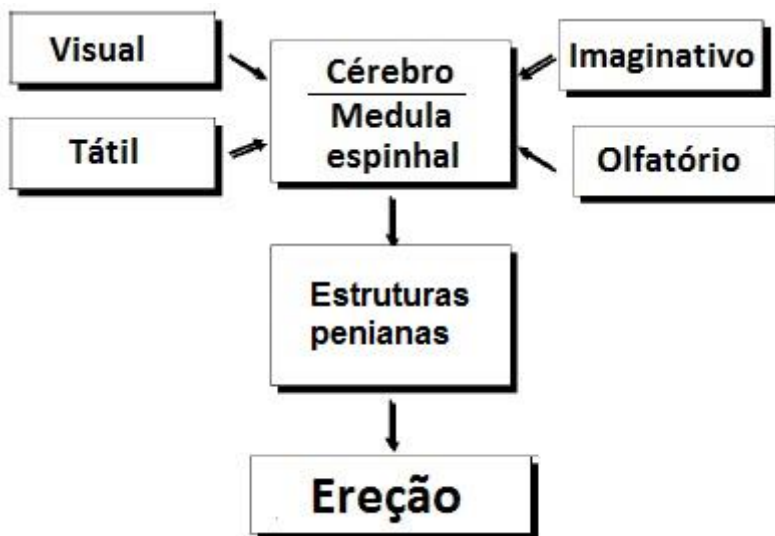
veias com o intuito de gerar venoconstrição e manter a ereção. Adaptado e traduzido de Lue, 2000.

Com relação às fibras nervosas presentes no pênis e relevantes para o controle do tônus, há a inervação autonômica, que é composta por fibras de pequeno calibre, pouco ou não mielinizadas, as quais coletivamente integram o nervo cavernoso. Além dela, existe a inervação somática (motora e sensorial), que também atua no controle do tônus do CC. As fibras somáticas motoras estão relacionadas ao controle voluntário dos impulsos para a musculatura esquelética, enquanto as somáticas sensoriais conduzem informações aferentes ao SNC a partir da pele do pênis, da glândula, da uretra e também do interior do CC. A via somática é composta por ramos do nervo podendo denominados nervo dorsal do pênis, nervo perineal e nervo inferior reto (Brooks, 2007; Awad *et al.*, 2011).

#### **1.1.4 Fisiologia da função erétil e os mediadores envolvidos**

Para o controle do tônus peniano há a participação tanto do sistema nervoso autônomo quanto somático. Deste modo, os vários estímulos táteis, olfativos, auditivos, visuais e imaginativos são processados e integrados por algumas áreas do sistema nervoso central (SNC), como os núcleos paraventriculares, área pré-óptica medial, hipocampo, amígdala medial, a substância cinzenta periaquedutal e o tegumento ventral (Andersson e Wagner, 1995; Andersson, 2011; Melis e Argiolas, 2011). Mecanismos espinhais e cerebrais são responsáveis por regular esses processos centrais e a ereção gerada por esses sistemas é chamada de psicogênica. A **FIGURA 4** esquematiza o processo:





**Figura 4 - Esquema da ereção psicogênica gerada através da interação de diversos estímulos.** Juntos, os estímulos gerados são regulados pela medula espinhal e atingem as estruturas penianas iniciando a ereção. Adaptado e traduzido de Andersson, 2001.

As principais moléculas que atuam nas diversas áreas do SNC, facilitando ou dificultando a ereção, são a serotonina, a dopamina, a oxitocina, os aminoácidos excitatórios, o óxido nítrico (NO), a adrenocorticotropina, e os peptídeos opióides. Além delas, andrógenos também têm um importante papel no controle da ereção. Por exemplo, a falta de testosterona pode diminuir ou abolir uma ereção gerada pelas moléculas citadas anteriormente (Andersson e Wagner, 1995; Andersson, 2011)

No controle periférico da ereção peniana há o envolvimento da inervação simpática, parassimpática, somática, contendo uma variedade de neurotransmissores responsáveis por regular o tônus peniano. Essa população de nervos é classificada de acordo com o neurotransmissor liberado em adrenérgicos, colinérgicos e não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC); sendo que todos os tipos de nervos podem conter mais de um neurotransmissor. Os NANC, além de neuropeptídeos, como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), podem conter ainda a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS I) e, portanto, sintetizar e liberar NO. Além dos neurônios, o endotélio encontrado nos sinusóides também é capaz de sintetizar e liberar o NO através da enzima óxido

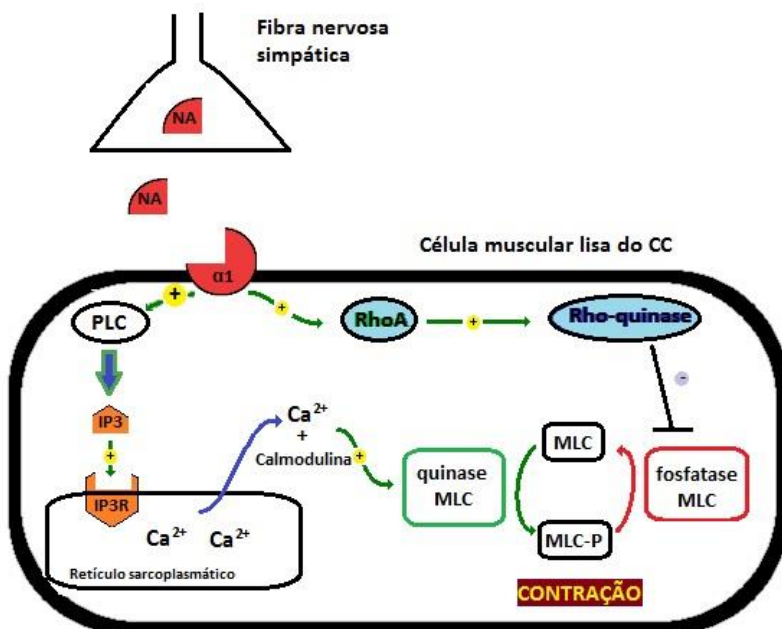
nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS III). O NO é uma molécula importante no relaxamento da musculatura lisa (Andersson e Wagner, 1995; Hedlund *et al.*, 2000; Andersson, 2011).

### 1.1.5 Mecanismos de contração

Na ausência de um estímulo sexual, o pênis é mantido flácido por intermédio da contração da vasculatura peniana e do corpo cavernoso. Estudos em humanos demonstraram que o principal mediador para a manutenção dessa contração é a noradrenalina (NA), liberada principalmente por terminações de fibras pós-ganglionares simpáticas. Nesses tecidos, a noradrenalina atua principalmente nos  $\alpha_1$ -adrenoreceptores pós-juncionais. Para uma revisão mais detalhada sobre os receptores adrenérgicos no pênis ver Traish *et al.* (1999).

Os adrenoreceptores- $\alpha_1$  são membros da família de receptores acoplados à proteínas G (GPCRs), preferencialmente à  $G_{q/11}$ , e a sua ativação resulta na ativação de fosfolipase C $\beta$  (PLC- $\beta$ ), enzima que realiza a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) para liberar trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> liga-se ao seu receptor que se encontra na membrana do retículo sarcoplasmático promovendo a liberação de cálcio ali estocado. O cálcio, agora em concentração citosólica acima do normal, forma um complexo com a calmodulina capaz de ativar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK fosforila a cadeia leve da miosina (MLC) resultando numa interação (por aumento de afinidade) dos filamentos grossos de miosina com os de actina, gerando a contração celular (Andersson e Stief, 1997; Simonsen *et al.*, 2002; Koshimizu *et al.*, 2003; Dean e Lue, 2005; Awad *et al.*, 2011). A ativação do adrenoreceptor  $\alpha_1$  ativa simultaneamente a via RhoA/Rho-quinase, a qual, independentemente do cálcio intracelular, inibe a fosfatase da cadeia leve da miosina, servindo de um mecanismo de manutenção da contração (**FIGURA 5**) (Simonsen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002).

Além da noradrenalina, outras moléculas são capazes de gerar ou modular a contração do CC, como as endotelinas, a serotonina, a angiotensina II, os prostanóides (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , TXA<sub>2</sub>) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (Andersson, 2011). O enfoque principal deste trabalho é dado à serotonina.



**Figura 5 - Mecanismo de contração de uma célula muscular lisa responsável por manter o estado flácido do pênis.** A noradrenalina, liberada das fibras nervosas simpáticas, atua em seu receptor adrenérgico  $\alpha_1$  gerando um aumento da atividade da enzima fosfolipase C (PLC) com consequente incremento de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub> se liga ao seu receptor IP<sub>3</sub>R, o qual se encontra no retículo sarcoplasmático, ocasionando a liberação de íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) do interior do retículo para o citosol. O Ca<sup>2+</sup> associa-se à calmodulina e ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLC) que, por sua vez, fosforila a MLC promovendo a contração celular. A ativação do adrenoreceptor  $\alpha_1$  causa ainda a ativação da enzima RhoA, que por sua vez ativa a Rho-quinase, a qual inibe a enzima fosfatase da MLC, auxiliando assim na manutenção da contração celular.

### 1.1.6 Mecanismos de relaxamento

O relaxamento das estruturas penianas, com consequente ereção peniana, se dá principalmente por ação do NO. O NO, liberado tanto do endotélio quando de terminações nervosas NANC, difunde-se pelas células musculares lisas causando a dilatação dessas estruturas. Na célula muscular lisa, o NO ativa a enzima guanilil ciclase (GC), o que por sua vez incrementa a quantidade de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). Há então a ativação das proteínas quinases G (PKG) que tem por função fosforilar diversos alvos, dentre eles canais iônicos de  $\text{Ca}^{2+}$  e receptores  $\text{IP}_3$ , o que resulta na redução dos níveis de cálcio citosólico e, consequentemente, promove o relaxamento da célula muscular; bem como o envolvimento de canais de  $\text{K}^+$  (Stief *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 2000; Lue, 2000; Simonsen *et al.*, 2002; Andersson, 2011).

Essa cascata de sinalização é regulada principalmente pela enzima fosfodiesterase (PDE) que tem por função quebrar ligações fosfodiester, como as que formam o GMPc, deixando-no na forma linear (GMP). Fármacos como a sildenafil (Viagra®) tem sua ação facilitadora da ereção peniana por inibirem a PDE do tipo 5, um subtipo considerado seletivo para o GMPc (Thompson, 1991; Andersson, 2001; Bender e Beavo, 2006).

### 1.1.7 Disfunção erétil

A disfunção erétil (DE) pode ser definida como a dificuldade parcial ou total de se obter e/ou manter a ereção peniana para um desempenho sexual satisfatório (Rodrigues e Reis, 1993).

Ela é tão comum que, no Brasil, um estudo realizado por Moreira Jr. *et al.* (2004) envolvendo 71.503 homens com 18 ou mais anos de idade demonstrou que 53,5% apresentaram algum grau de DE. Mostraram ainda que, no Brasil, assim como no restante do mundo, tanto a prevalência quanto a severidade da DE depende diretamente da idade do paciente. Em outro estudo, realizado por Abdo *et al.* (2006), com 2862 homens de 18 a 70 anos de idade, foi observado uma prevalência de DE em 45% da população analisada.

Antes disso, em 1999, Aytaç *et al.* publicaram um artigo com estimativas de que, no mundo, mais de 152 milhões de homens sofreram com algum tipo de DE no ano de 1995. Para o ano de 2025, esses autores preveem a prevalência de DE em homens em torno de 322 milhões.

A DE pode ser classificada como de natureza psicogênica ou orgânica, sendo que 80% dos casos podem ter uma causa orgânica. As causas da DE de natureza orgânica podem ser subdivididas em vascular, neurogênica, anatômica e hormonal. Pode ainda ser classificada de acordo com a intensidade em leve, moderada ou completa. É importante ressaltar que mesmo tendo etiologia primária orgânica, a DE é considerada multifatorial, pois o componente psicológico coexiste nesses casos (Diaz Jr e Close, 2010). Portanto, é evidente que a DE compromete a qualidade de vida dos pacientes e de seus respectivos parceiros, bem como pode ser indício de doenças subjacentes como: diabetes, hipertensão arterial, hipogonadismo, doença vascular periférica, dislipidemias e doenças neurológicas. Outros fatores também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da DE, dentre os mais citados estão o tabagismo, alcoolismo, abuso de drogas e estilo de vida sedentário (Feldman *et al.*, 1994; Lue, 2000; Andersson, 2011). Além disso, questões socioeconômicas e o nível de educação do indivíduo também parecem estar envolvidos (Johannes *et al.*, 2000).

O tratamento da DE, assim como de outras diversas desordens, tem evoluído com o passar do tempo. A partir da década de 1980, injeções intracavernosas com agentes farmacológicos começaram a ser utilizadas no intuito de induzir ereção peniana (Bivalacqua *et al.*, 2000). Desde então, vários fármacos vasoativos foram utilizados como a papaverina, um composto classificado como inibidor da PDE, mas com outras diversas ações, e a fentolamina, um antagonista competitivo de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Apesar de terem sido muito importantes no tratamento da DE, injeções intracavernosas podem causar dor, hipotensão e uma reação fibrótica local. A mudança nesse paradigma surgiu com o desenvolvimento de fármacos de uso oral, principalmente com o advento da sildenafil. (Bivalacqua *et al.*, 2000; Lue, 2000). No entanto, parte dos pacientes não responde a esse tipo de tratamento (Eardley e Sethia, 2003), abrindo espaço para a busca de novos mecanismos envolvidos no processo de contração-relaxamento das estruturas penianas, bem como de novos fármacos para o tratamento da DE.

## 1.2 5-HIDROXITRIPTAMINA

A 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina) foi descoberta na década de 1930 por Vittorio Erspamer enquanto pesquisava o efeito de diversas aminas, obtidas da pele e do trato intestinal de animais, na contratilidade da musculatura lisa. Erspamer demonstrou interesse

especial por uma substância encontrada nas células enterocromafins intestinais, a qual chamou de **enteramina** (Whitaker-Azmitia, 1999). Em 1948, Maurice M. Rapport, Arda A. Green e Irvine H. Page publicaram uma série de artigos relatando a descoberta de uma substância oriunda do soro bovino com estrutura semelhante àquela do triptofano ou da triptamina e com atividade vasoconstrictora, qual foi chamada de **serotonina**. Após um ano da descoberta da serotonina, Rapport estudando a estrutura química da serotonina, conseguiu desvendar a sua forma molecular ( $C_{10}H_{21}ON_2$ ) e a denominou-se 5-hidroxitriptamina (Rapport, 1949).

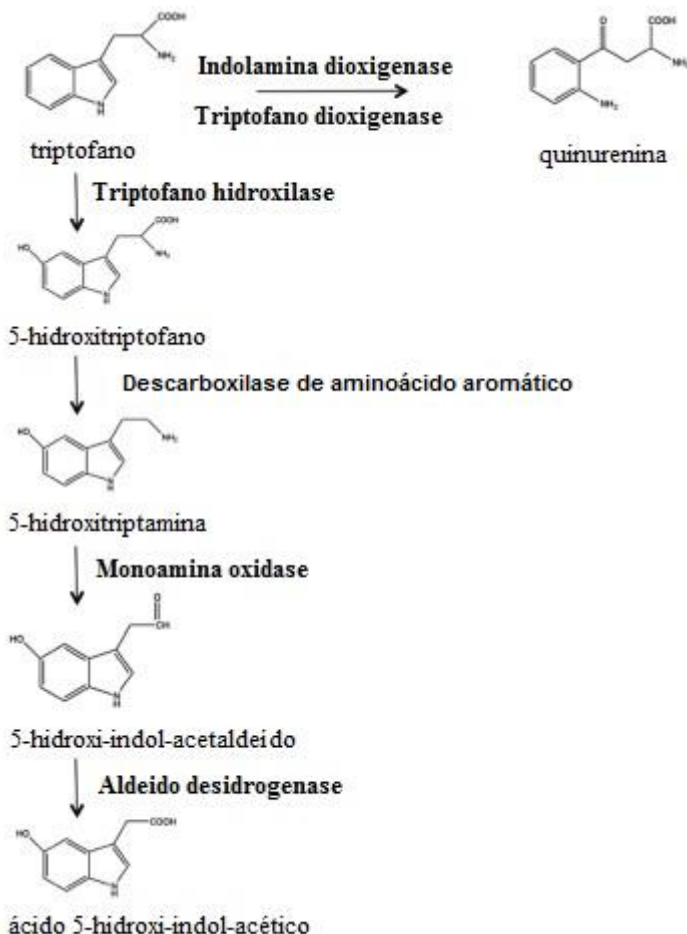
Em 1952, Erspamer e Asero, em uma publicação na Nature, demonstraram que a estrutura química da enteramina é a 5-hidroxitriptamina. Desta forma, a enteramina e a serotonina são a mesma substância (Erspamer e Asero, 1952).

Além do papel inicial de modular o tônus vascular, a 5-HT é bem conhecida por atuar como um neurotransmissor. Essa descoberta deve-se aos trabalhos iniciais de Betty Mack Twarog que desde 1949, durante seu doutorado em Harvard, investigou possíveis neurotransmissores na musculatura lisa do mexilhão *Mytilus edulis*. Além de Twarog, outro importante pesquisador nesse campo foi Dilworth Wayne Woolley, que investigou o papel da 5-HT no cérebro e em doenças mentais (Whitaker-Azmitia, 1999).

### 1.2.1 Biossíntese, transporte, captação e biotransformação

A biossíntese da 5-HT (**FIGURA 6**) se dá a partir do aminoácido L-triptofano, obtido de alimentos como ovo, chocolate, laticínios (iogurte, queijo, leite), carnes e nozes. De todo L-triptofano absorvido, somente 5 a 10% seguem para a rota de síntese da 5-HT, sendo o restante metabolizado em quinurenina, molécula importante para a formação de melatonina, pelas enzimas indolamina dioxigenase e triptofano dioxigenase (Stone e Darlington, 2002; Watts *et al.*, 2012).

A primeira etapa (etapa limitante) para a formação da 5-HT se dá pela conversão do L-triptofano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH). A TPH é conhecida em duas isoformas independentes, TPH<sub>1</sub>, presente em tecidos extra neurais, e TPH<sub>2</sub>, expressa principalmente no SNC (Walther, Peter, Bashammakh, *et al.*, 2003). Em seguida, a descarboxilase de aminoácidos L-aromáticos (AADC) remove a carboxila do 5-HTP, formando a 5-HT.



**Figura 6 - Síntese e metabolismo da 5-HT.** Adaptado de Watts *et al.*, 2012.

O metabolismo da 5-HT (**FIGURA 6**) ocorre por ação da monoamina oxidase (MAO), seguida da aldeído desidrogenase (ADH), com formação do ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), um metabólito estável. A MAO é uma proteína integral da membrana mitocondrial (Rendu *et al.*, 2011), portanto, o metabolismo da 5-HT ocorre intracelularmente. A 5-HT do meio extracelular pode ser captada pelas células (**FIGURA 7**), o que ocorre principalmente através do transportador de serotonina (SERT), mas também pode ocorrer por

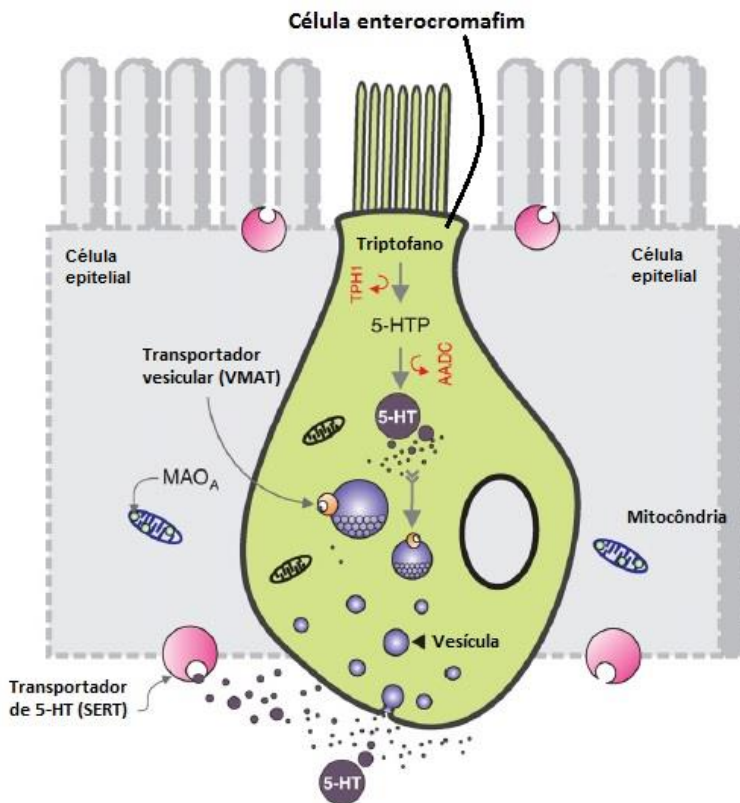
outras vias, como por exemplo através dos transportadores de noradrenalina (NET) (Watts *et al.*, 2012). A MAO existe em duas isoformas: MAO-A e MAO-B; a diferença consiste principalmente na seletividade por substratos e inibidores. Deste modo, a degradação da 5-HT é feita preferencialmente pela MAO-A. Periféricamente, os tecidos que contribuem significativamente para o metabolismo da 5-HT são os pulmões, intestino e as células endoteliais do sistema vascular (O'carroll *et al.*, 1983; Watts, 2005).

A maior parte da 5-HT corporal (95%) é produzida pelas células enterocromafins da mucosa intestinal (**FIGURA 7**) (Racké *et al.*, 1995; Kidd *et al.*, 2008). No entanto os pulmões, algumas regiões cerebrais e células do músculo liso vascular também são capazes de sintetizá-la (Ni e Watts, 2006). Após a síntese, a 5-HT é armazenada em vesículas através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) (**FIGURA 7**) (Schäfermeyer *et al.*, 2004). No caso das células enterocromafins, após a síntese da 5-HT, ela pode ser liberada da célula e seguir por diferentes caminhos:

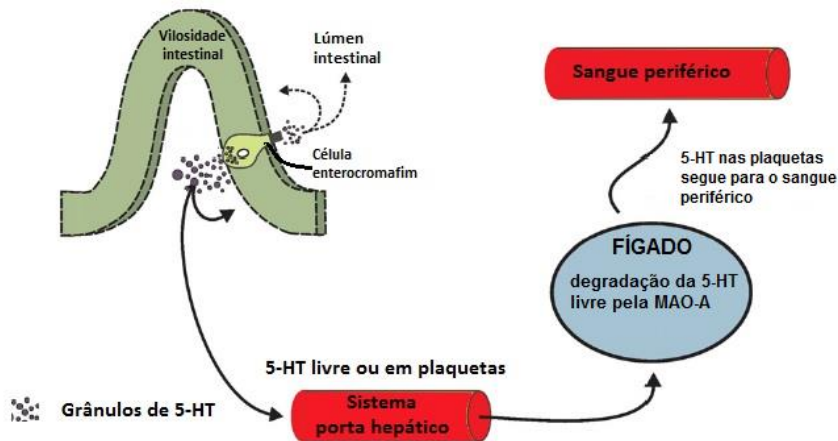
- Ser captada e/ou interagir com células vizinhas, como as epiteliais (Martel *et al.*, 2003) (**FIGURA 7**), nervosas e do sistema imune (Gershon, 2004);
- Ser liberada no lúmen intestinal e ser então eliminada junto com as fezes (**FIGURA 8**) (Tsukamoto *et al.*, 2007);
- Ser liberada na lâmina própria intestinal e então entrar na circulação sanguínea (através da circulação êntero hepática), e permanecer livre ou ser captada por plaquetas via SERT (**FIGURA 8**) (Bertrand e Bertrand, 2010).

A 5-HT liberada na forma livre dentro do sangue é rapidamente degradada pela MAO-A assim que chega ao fígado, garantindo a baixa concentração sanguínea de 5-HT. De modo contrário, a 5-HT captada pelas plaquetas fica protegida desse mecanismo de degradação hepático e consegue entrar na circulação sistêmica (**FIGURA 8**) (Bertrand e Bertrand, 2010). A existência de um sistema de transporte dependente de sódio para a 5-HT em plaquetas foi elucidada por Sneddon (1969). Na época, ele definiu o que hoje conhecemos por SERT como um transportador localizado na membrana das plaquetas.





**Figura 7 - A produção de 5-HT em uma célula enterocromafim.** No topo da figura o triptofano serve de base para a formação do 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da enzima triptofano hidroxilase tipo 1 (5-HTP<sub>1</sub>). O 5-HTP é então convertido em 5-HT pela aminoácido aromático descarboxilase (AADC), para então ser armazenado em vesículas através do seu transportador vesicular (VMAT). É possível observar ainda o processo de liberação da 5-HT vesiculada e sua recaptação através do transportador de 5-HT (SERT) pelas células epiteliais vizinhas. A isoforma da monoamina oxidase (MAO-A) também é representada (localizada na mitocôndria) e tem a função de promover a degradação da 5-HT em seus metabólito, principalmente o ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA). Adaptado e traduzido de (Bertrand e Bertrand, 2010).



**Figura 8 - O ciclo da 5-HT: da origem até o sangue periférico.** A 5-HT gerada nas células enterocromafins pode ser liberada no lúmen intestinal e atuar nas células vizinhas, tanto em receptores serotoninérgicos ou captadas via SERT, ou ainda ser eliminada junto das fezes. Se liberada na base da vilosidade (lâmina própria intestinal), pode também atuar nas células vizinhas como neurônios ou cair na circulação porta hepática, na forma livre ou serem captadas, através do SERT, por plaquetas. A 5-HT livre é degradada pela enzima MAO-A ao passar pelo fígado, já a 5-HT captada pela plaqueta segue para o sangue periférico e a circulação geral. Traduzido e adaptado de Bertrand e Bertrand, 2010.

Com relação ao processo de captação e metabolização da 5-HT nas estruturas penianas, De Lima e Silva (2013) demonstrou, por quantificação através de cromatografia líquida de alta eficiência, que tanto o CC quanto a VDP são capazes de captar a 5-HT e de metabolizá-la em 5-HIAA. Um fato interessante observado foi que essa captação independe dos transportadores SERT, NET ou da dopamina (DAT), sugerindo que outros sistemas de transporte também podem participar desse processo de captação de 5-HT. Um possível mecanismo, sugerido no trabalho, é o de que esse transporte ocorra através de transportadores de cátions orgânicos, dado a sua capacidade de realizar o transporte de diversas monoaminas, como a 5-HT (Jonker e Schinkel, 2004).

### 1.2.2 Receptores para a 5-HT

A maior parte da ação da 5-HT se dá por ativação de seus receptores, os quais foram classificados em sete famílias (5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub>), com pelo menos 15 subtipos distintos em mamíferos. Essa grande variedade de receptores explica, ao menos parcialmente, o grande leque de ações possíveis da 5-HT em sistemas biológicos complexos, como é o caso do rato e do homem. Essa divisão leva em consideração os seguintes critérios:

- Operacionais, como a seletividade de agonistas e antagonistas para cada subtipo de receptor;
- Estruturais (sequência de aminoácidos);
- Transducionais, que consideram os mecanismos de transdução de sinais intracelulares.

Com exceção do receptor 5-HT<sub>3</sub>, um receptor ionotrópico (canal iônico operado por ligante), todos os demais são metabotrópicos (acoplados a proteínas G) (Hoyer *et al.*, 1994; Barnes e Sharp, 1999).

A seguir é apresentado um breve resumo das famílias e subtipos de receptores serotoninérgicos. Maiores informações podem ser encontradas nas revisões de Hoyer *et al.* (1994) e de Barnes & Sharp (1999).

A família 5-HT<sub>1</sub> é composta por receptores acoplados à proteínas G<sub>i/o</sub>, com a função mais evidenciada de inibir a adenilil ciclase, reduzindo assim os níveis de AMPc, entretanto, outras vias transducionais podem ocorrer. A variedade de subtipos vai de 5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>1F</sub>, o que permite uma diferente seletividade para os fármacos, bem como uma expressão diferenciada ao longo do corpo.

A família 5-HT<sub>2</sub> apresenta três membros, 5-HT<sub>2A</sub> a 5-HT<sub>2C</sub>. Diferentemente da família 5-HT<sub>1</sub>, os membros da 5-HT<sub>2</sub> estão ligados a uma proteína G com ativação da fosfolipase C, ou seja, sua ativação desencadeia um aumento de IP<sub>3</sub> seguido do incremento de cálcio intracelular.

A família 5-HT<sub>3</sub> é a exceção das famílias, pois é o único membro pertencente ao grupo de canais iônicos operados por ligante. Esse complexo (receptor + canal) apresenta-se na forma de um pentâmero, ou seja, é formado por cinco subunidades denominadas de 5-HT<sub>3A-E</sub>. Este complexo é um canal de cátions não seletivo, sendo permeável

principalmente para íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , mediando processos de sinalização rápida.

A família 5-HT<sub>4</sub>, por sua vez, interage positivamente com a proteína G<sub>s</sub>, ocasionado, de modo oposto ao visto na família 5-HT<sub>1</sub>, uma ativação da enzima adenilil ciclase, incrementando os níveis de AMPc.

A família 5-HT<sub>5</sub> apresenta 2 subtipos de receptores, o 5-HT<sub>5A</sub> e o 5-HT<sub>5B</sub> e, apesar de serem considerados receptores acoplados à proteína G, ainda não há um consenso sobre o sistema transducional desses receptores, assim como de suas funções fisiológicas. Presume-se que o receptor 5-HT<sub>5A</sub> atue via proteína G<sub>i</sub>, inibindo assim a adenilil ciclase. Entretanto, há ainda a possibilidade de um processo transducional com incremento da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, entre outras possíveis vias ainda discutidas (Francken *et al.*, 1998; Hurley *et al.*, 1998; Noda *et al.*, 2003).

Tanto a família 5-HT<sub>6</sub> quanto a 5-HT<sub>7</sub> apresentam um único membro e possuem em comum que sua ativação resulta na ativação da adenilil ciclase através da proteína G<sub>s</sub>.

### 1.2.3 Alteração no tônus da musculatura lisa induzida por 5-HT

Como visto anteriormente, uma das primeiras funções identificadas da 5-HT foi a de modificar o tônus da musculatura lisa, principal constituinte muscular dos vasos e do corpo cavernoso.

De modo geral, qualquer vaso sanguíneo quando montado em um sistema de órgão isolado, apresenta resposta contrátil ao ser estimulado por 5-HT. Apesar da capacidade contrátil ser predominante, respostas de relaxamento também são possíveis de serem observadas em vasos estimulados por 5-HT. Isto pode ser explicado pela variedade de receptores existentes e também pela expressão diferenciada em cada tecido ou espécie (Watts *et al.*, 2012). Por exemplo, a 5-HT induz relaxamento em veia cava de suínos (Trevethick *et al.*, 1984), enquanto que na veia cava de coelhos induz uma modesta contração (Hellegourach *et al.*, 1985). Em ratos, uma contração de 70% da obtida por noradrenalina foi observada (Linder, Ni, *et al.*, 2007). Essa diferença interespecie pode ser observada não apenas na musculatura lisa vascular, como também no corpo cavernoso. É importante salientar que, de modo geral, a 5-HT é capaz de induzir uma contração dependente de concentração no CC.

Em humanos, a utilização de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (NAN-190), 5-HT<sub>2A</sub> (ketanserina) e 5-HT<sub>4</sub> (SB 203186) diminuiu ou aboliu a contração induzida por 5-HT em CC (Lau *et al.*, 2006).

Em coelhos, assim como nos humanos, foi possível suprimir a resposta contrátil induzida por 5-HT com antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (WAY100635), 5-HT<sub>2</sub> (LY53857) e 5-HT<sub>2A</sub> (ketanserina). Entretanto, o antagonista de receptores 5-HT<sub>4</sub> SDZ 205557 potencializou a contração induzida pela 5-HT; demonstrando a existência de algumas diferenças interespecies. (Furukawa *et al.*, 2003). É importante notar que a potencialização da resposta contrátil induzida pelo SDZ 205557 sugere que, no CC de coelhos, a 5-HT pode participar tanto da promoção de contração quanto de relaxamento dessa estrutura.

Furukawa *et al.* (2003) também observaram que o antagonista LY 278584 (5-HT<sub>3</sub>) não altera o perfil da contração induzida pela 5-HT, sugerindo que este receptor não participa na mediação da contração induzida por 5-HT em CC de coelhos

Há uma escassez de trabalhos focando na contração induzida por 5-HT no CC de ratos, o que estimulou a realização do presente trabalho.

#### **1.2.4 O controle do tônus muscular pela 5-HT independente de receptor**

A 5-HT pode modular o tônus muscular de modo independente da ativação de receptores. Após a captação da 5-HT pela célula, há, por intermédio da enzima transglutaminase, a transaminação da 5-HT com resíduos de glutamina de diversas moléculas, como as pequenas GTPases (Walther, Peter, Winter, *et al.*, 2003) e proteínas contráteis, como a  $\alpha$ -actina (Watts *et al.*, 2009). Essa transaminação resulta em uma ligação covalente do tipo glutamílica-amida, processo conhecido como serotonilação. Este processo foi primeiramente descrito em plaquetas (Walther, Peter, Winter, *et al.*, 2003) e, em 2009, Watts *et al.* o observaram no músculo liso vascular. Naquele trabalho, a inibição da transglutaminase aboliu a resposta contrátil induzida por 5-HT em aorta de ratos, revelando a importância fisiológica do processo de serotonilação na musculatura lisa.

#### **1.2.5 A serotonina e a função erétil**

Inicialmente, trabalhos como o de Ahlenius *et al.* (1971) e o de McIntosh & Barfield (1984) sugeriram que a diminuição nos níveis de 5-HT no SNC facilitaria o comportamento sexual em diversas espécies, assim como o contrário, o aumento nos níveis de 5-HT no SNC, funcionaria como um inibidor das funções sexuais. Entretanto, sabe-se hoje que ela possui tanto uma ação facilitadora ou inibidora das funções

sexuais, dependendo de quais subtipos de receptores são ativados em diferentes áreas do SNC (Svensson e Hansen, 1984; Andersson, 2011).

Com relação aos mecanismos periféricos, Finberg & Vardi (1990) observaram um aumento da pressão intracavernosa (indicador de tumescência e ereção peniana), ao realizar o estímulo da parte sacral da medula espinhal. Ao injetar intravenosamente 5-HT, eles observaram uma inibição do aumento da pressão, efeito bloqueado quando utilizados os compostos metisergida (antagonista 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>) e metiotepina (potente antagonista 5-HT<sub>2</sub>, e também 5-HT<sub>1</sub>), mas não por ketanserina (antagonista 5-HT<sub>2</sub>) ou MDL 72222 (antagonista 5-HT<sub>3</sub>).

Deste modo, fármacos que alteram a homeostasia da 5-HT são capazes de alterar a resposta sexual do indivíduo, seja por mecanismos centrais ou periféricos. Há de se considerar que a 5-HT por si só pode ser um agente contrátil, e que seus agonistas/antagonistas podem modular a contratilidade das células musculares lisas das artérias e arteríolas penianas, bem como do próprio CC.

Estudos já demonstraram que a incidência de DE é maior entre indivíduos com depressão maior do que em indivíduos sadios (Rosen e Marin, 2003). Além disso, alguns desses indivíduos com depressão também apresentam uma perda reversível da tumescência noturna do pênis, comum em indivíduos sadios (Roose *et al.*, 1982; Steiger *et al.*, 1993). Deste modo, pode-se supor que o tratamento da depressão pode ser benéfico na função erétil desses pacientes. Os principais fármacos utilizados no tratamento da depressão modulam a homeostasia da 5-HT, como os inibidores da MAO, os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da recaptação de serotonina (ISRS). Ainda, apesar de serem úteis no tratamento da depressão, esses medicamentos podem alterar a função erétil e causar a piora de uma DE pré-existente (Rosen e Marin, 2003).

A trazodona, um antidepressivo atípico capaz de inibir a recaptação central de 5-HT, mas também capaz de bloquear receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos, possui como principal metabólito o m-CPP. O m-CPP é um agonista de receptores 5-HT<sub>1A/1B</sub> e, principalmente 5-HT<sub>2C</sub>, sendo capaz de induzir ereções espontâneas (Azadzoi *et al.*, 1990; Hoyer *et al.*, 1994). Apesar disso, sabe-se que a trazodona e o m-CPP também são capazes de bloquear receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, sendo este outro possível mecanismo para a ereção espontânea observada nesses indivíduos (Krege *et al.*, 2000).

Há ainda um caso reportado de um paciente que, fazendo o uso de fluoxetina, um ISRS, para o tratamento de sua depressão, apresentou um quadro de priapismo com duração de aproximadamente 10 horas (Javed,

1996). Priapismo é uma ereção espontânea, dolorosa, prolongada e potencialmente danosa ao pênis. De modo geral, os ISRS são associados ao oposto do priapismo, ou seja, dificultam a ereção peniana. Diversos trabalhos relatam o aumento da DE com o uso desses medicamentos, dentre eles, os usuários de paroxetina são considerados os com maior prevalência da DE com relação aos que usam outros ISRS como a fluoxetina, fluvoxamina e sertralina (Montejo-González *et al.*, 1997).

Com base nessa introdução, na qual foi revisado boa parte da literatura científica disponível, parece claro que a 5-HT é capaz de gerar contração do CC de rato, o que por si só seria um mecanismo que dificultaria a ereção peniana. Indo na contramão desta hipótese, dados não publicados de nosso laboratório mostram que a administração intraperitoneal de 5-HT causa ereção espontânea de rato. Esses dados deixam em aberto uma grande questão: qual a participação da 5-HT na função erétil? Será que a contração gerada pela 5-HT no CC é relevante para a ereção ou é a noradrenalina que realmente mantém a contração do pênis? Será que essa contração gerada pela 5-HT é consistente ou pode sofrer taquifilaxia?





---

## OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a resposta contrátil do CC de rato à 5-HT.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se há liberação neuronal de 5-HT no CC de rato;
- Avaliar o perfil contrátil gerado pela 5-HT em CC de rato, isto é, verificar tanto a resposta contrátil com o uso de diferentes concentrações de 5-HT, quanto a reprodutibilidade dessa resposta contrátil após vários estímulos;
- Caracterizar farmacologicamente os receptores envolvidos na resposta contrátil induzida por 5-HT em CC de rato.
- Verificar se o mecanismo de perda de resposta contrátil envolve a participação de caveolas;
- Investigar o papel do metabolismo celular e da captação da 5-HT na resposta contrátil do CC de rato.

## MATERIAL E MÉTODO

### 3.1 Animais

Para o estudo foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* (wistar machos), com três meses de idade e pesando entre 280-350 g. Os animais foram disponibilizados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia com livre acesso a água e ração, em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h cada). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA, processo nº PP00706).

### 3.2 Coleta e preparo dos tecidos

Para os protocolos experimentais, foram utilizados o corpo cavernoso (CC) e a veia dorsal peniana (VDP). Para coletar os tecidos, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (15mg/kg) administradas por via intraperitoneal (IP). Após a completa anestesia, os animais foram eutanasiados por pneumotórax, ocasionada pela abertura da cavidade torácica. O pênis foi retirado na região de inserção da crura e colocado em uma placa de petri contendo solução salina fisiológica (SSF), cuja composição está detalhada no **QUADRO 1**:

**Quadro 1 - Composição da solução salina fisiológica (SSF)**

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	131,3
KCl	4,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,18
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,17
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,6
Dextrose	5,6
NaHCO <sub>3</sub>	14,9
EDTA	0,08

Com auxílio de uma lupa e de materiais cirúrgicos, os tecidos adjacentes ao CC, bem como a VDP e a uretra foram removidos e descartados, exceto nos protocolos em que a VDP foi utilizada. Nesses protocolos, a VDP foi também dissecada tendo os tecidos adjacentes removidos. Cada CC foi seccionado em duas tiras (direita e esquerda) e,

as veias, quando utilizadas, foram seccionadas em 2 anéis de aproximadamente 5 mm de comprimento cada.

### 3.3 Procedimentos experimentais

#### 3.3.1 Montagem e preparo dos tecidos em cubas de órgão isolado para medidas de tensão isométrica

Os tecidos (anéis de VDP ou tiras de CC) devidamente dissecados e segmentados (item 3.2), foram montados em cubas de órgão isolado para medidas de tensão isométrica. As cubas foram preenchidas com SSF (6 mL para CC e 2 mL para VDP), mantidas a 37 °C e aeradas com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Os tecidos permaneceram sob uma tensão basal de 250 mg para CC e 600 mg para VDP por um período de 60 minutos para estabilização, sendo a SSF trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, os tecidos foram estimulados com fenilefrina (10 µM) (Teste de viabilidade 1) para obtenção de uma resposta contrátil com duração de 15 min. A SSF foi substituída diversas vezes até a tensão retornar ao nível basal (aproximadamente 35 min) e um novo estímulo com fenilefrina (10 µM) foi realizado para obtenção de uma segunda resposta contrátil também com duração de 15 min (Teste de viabilidade 2). Em alguns protocolos experimentais, a fenilefrina foi substituída por outro agente contrátil conforme discutido adiante.

Foram considerados viáveis as tiras de CC que apresentaram mais de 70 mg de contração e os anéis de VDP com mais de 400 mg de contração em ao menos um dos testes de viabilidade descritos acima. Após os testes de viabilidade, a SSF foi trocada diversas vezes até o retorno da tensão à linha basal antes da realização de diferentes protocolos experimentais.

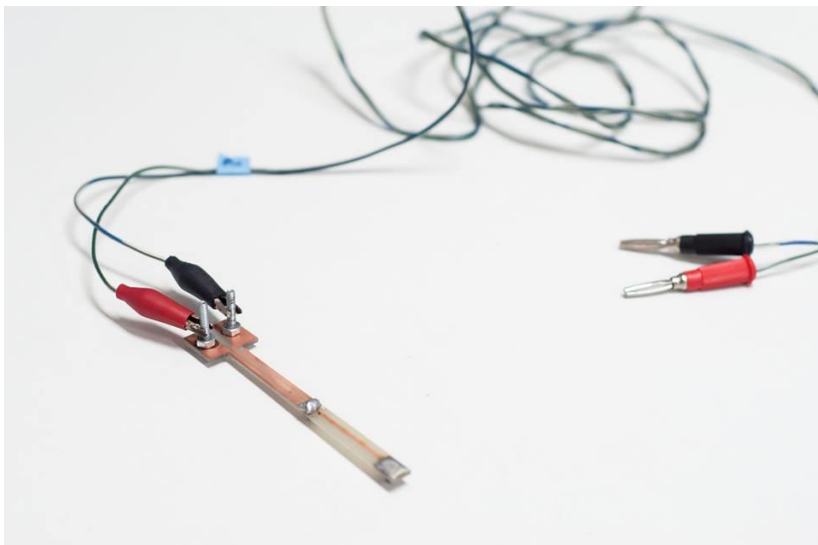
##### 3.3.1.1 Sistema para órgãos isolados utilizado para a obtenção das medidas de tensão isométrica.

O sistema (**FIGURA 9**) consiste em cubas de vidro com capacidade para 6 mL (para o CC) ou 2 mL (para a VDP) de SSF fixadas a um suporte (**FIGURA 10**). Para o registro das variações de tensão, foram utilizados transdutores de força isométrica (Grass Instruments Co, EUA ou ADInstruments, Austrália) acoplados a um sistema de aquisição de dados Powerlab, versão 7.2 AD Instruments,

Austrália. Para a EEC, foi utilizado um estimulador modelo LE 12406 TC (Panlab, Espanha).



**Figura 9 - Sistema para órgão isolado.** Em A visualiza-se o transdutor; em B o suporte para fixação do órgão, nesse caso o CC; em C a cuba, nesse caso com capacidade de 6 mL. Fonte: gentilmente cedida por Denise Curi da Cunha, 2014.



**Figura 10 - Haste para fixação do corpo cavernoso.** Verifica-se que a haste possui um aparato para fixação dos plugs que são ligados ao gerador de pulso elétrico (não mostrado). Fonte: gentilmente cedida por Denise Curi da Cunha, 2014.

### **3.3.2 Avaliação da contração induzida por 5-HT em corpo cavernoso de rato**

Uma curva concentração-resposta cumulativa (CCRC) foi realizada para verificar a capacidade da 5-HT exógena em contrair o CC. As concentrações de serotonina utilizadas variaram de 10 nM a 100  $\mu$ M, aplicadas de modo crescente e cumulativo com um intervalo de 5 minutos entre administração de cada concentração.

Como controle, outro grupo experimental foi realizado utilizando a fenilefrina como agente contrátil; de maneira semelhante (concentrações e intervalo de tempo) ao da 5-HT.

### **3.3.3 Avaliação da liberação neuronal de transmissores contráteis em corpo cavernoso de rato**

Sabe-se que a noradrenalina é a principal substância liberada pelos neurônios capaz de contrair o corpo cavernoso atuando nos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Para verificar se a 5-HT também é liberada por neurônios intracavernosos do CC, alguns protocolos utilizando estimulação elétrica de campo (EEC) foram realizados. Em todos os

protocolos, o tempo de incubação com os fármacos foi de 30 min e, após esse período, os tecidos foram estimulados com trens de pulsos retangulares de 1 ms de duração e intensidade de 20 V, 64 Hz, durante 10 s. A EEC foi aplicada através de dois eletrodos de platina presentes no suporte, sendo um deles um gancho localizado abaixo da preparação e o outro um anel localizado acima desta. Esse experimento foi padronizado em nosso laboratório por Leitolis (2013) e a frequência escolhida foi a penúltima da obtida na curva frequência-resposta obtida por Leitolis.

Com o intuito de evitar a interferência de mecanismos de relaxamento, todos os tecidos foram incubados com L-NAME (100  $\mu$ M), um inibidor da sintase do óxido nítrico, e atropina (1  $\mu$ M), um antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos. Além do grupo controle, recebendo somente L-NAME e atropina, os seguintes protocolos foram desenvolvidos:

- Para inibir a liberação de noradrenalina na junção neuromuscular, o tecido foi incubado com guanetidina, um fármaco que inibe a sua liberação. Duas concentrações de guanetidina foram utilizadas, 10 e 100  $\mu$ M, baseadas nos trabalhos de Benvindo *et al.* (2011) e Kim *et al.* (2010);
- Para avaliar se a contração observada se dá por ativação de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos utilizamos prazosina, um antagonista seletivo desses receptores. Duas concentrações de prazosina foram utilizadas, 0,1 e 1  $\mu$ M, de acordo com os trabalhos de Mizusawa *et al.* (2002) e El-Metwally *et al.* (2007);
- Um terceiro protocolo foi empregado utilizando juntamente a prazosina 0,1  $\mu$ M e a guanetidina 10  $\mu$ M;
- Para verificar se o sistema serotoninérgico estaria modulando a liberação de noradrenalina e, dessa forma gerando a contração do CC de rato, tiras de CC foram incubadas com prazosina (0,1  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M) por 30 minutos. Essas concentrações foram utilizadas pois antagonizaram com sucesso a contração induzida por EEC. Após a incubação, o tecido foi estimulado com 5-HT exógena (100  $\mu$ M). Como controle, tiras de CC foram estimuladas com fenilefrina (FE; 10  $\mu$ M), um agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico na presença e ausência de prazosina (0,1  $\mu$ M).



### **3.3.4 Avaliação da reprodutibilidade do perfil contrátil do corpo cavernoso e veia dorsal peniana frente a agentes contráteis**

Com o intuito de avaliar a reprodutibilidade da resposta contrátil frente a vários estímulos de 5-HT exógena e fenilefrina, tiras de CC ou anéis de VDP foram estimulados quatro vezes (E1, E2, E3 e E4) com 5-HT (100  $\mu$ M) ou fenilefrina (10  $\mu$ M). Tiras de CC, mas não a VDP, também foram estimuladas quatro vezes com solução de KCl (80 mM) isotônico (obtido por substituição de NaCl por KCl na SSF). Cada tira foi estimulada com um único agente contrátil. As respostas a cada estímulo foram registradas por um período de 15 min e, após esse período, a SSF foi trocada diversas vezes para garantir o retorno à linha basal (aprox. 35 min). No grupo experimental em que a contração foi induzida por KCl, os testes de viabilidade também foram realizados utilizando KCl na mesma concentração (80 mM) e não com fenilefrina, como feito nos demais grupos.

### **3.3.5 Participação das caveolas na resposta taquifilática induzida por 5-HT**

Para verificar a participação das caveolas no processo taquifilático induzido pela serotonina, uma CCRC foi desenvolvida para 5-HT exógena (10 nM até 100  $\mu$ M). Neste experimento, as tiras foram incubadas com o composto metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) na concentração de 10 mM por um período de uma hora. A concentração e o tempo de incubação utilizados foram os mesmos em que Linder *et al.* (2007) empregaram esse composto para causar o desarranjo das caveolas em aorta de rato. Como controle, paralelamente outra CCRC para 5-HT exógena na ausência de M $\beta$ CD foi desenvolvida, respeitando o tempo de incubação de uma hora.

### **3.3.6 Influência da captação e do metabolismo da 5-HT na resposta contrátil em corpo cavernoso de rato**

Sabendo que o CC de rato é capaz de captar e metabolizar a 5-HT formando o 5-HIAA, fármacos foram utilizados com o intuito de desvendar o papel desde a captação até a metabolização da 5-HT, bem como do próprio metabólito 5-HIAA, na resposta contrátil do CC de rato.

Para tal estudo, desenvolveram-se CCRC para 5-HT, semelhantes àquelas do protocolo 3.3.1, mas pré-incubadas por 30 min com a fluoxetina (1  $\mu$ M), um ISRS e pargilina (100  $\mu$ M), um inibidor da MAO. Como controle para ambos os grupos, outra CCRC para 5-HT foi desenvolvida respeitando os 30 min de pré-incubação, mas sem o uso de nenhum fármaco.

Em outro protocolo, tiras de CC foram incubadas com pargilina (100  $\mu$ M) por 30 min e então foram estimuladas uma única vez (E1) com 5-HT (100  $\mu$ M).

Para avaliar o papel do 5-HIAA na resposta contrátil, tiras de CC foram estimuladas com 5-HIAA (100  $\mu$ M).

A concentração de pargilina utilizada foi baseada nos experimentos de De Lima E Silva (2013), nos quais conseguiu inibir eficazmente a MAO, impedindo a formação de 5-HIAA, em CC de rato quando incubada na concentração de 100  $\mu$ M.

### **3.3.7 Caracterização farmacológica dos receptores serotoninérgicos envolvidos na contração do corpo cavernoso de rato**

Para verificar quais receptores serotoninérgicos estão envolvidos na contração induzida por 5-HT no CC de rato, foram utilizados os agonistas e antagonistas serotoninérgicos descritos nos **QUADROS 1 e 2**, nas concentrações indicadas.

**Quadro 2 - Lista de agonistas utilizados na caracterização farmacológica de subtipos de receptores serotoninérgicos**

Fármaco	Concentração	Receptores em que atua (Referência)
Bupiriona	100 $\mu$ M	Agonista parcial 5-HT <sub>1A</sub> (Ki = 8,9 $\eta$ M) (Newman-Tancredi <i>et al.</i> , 1998)
CGS 12066B	100 $\mu$ M	Agonista pleno 5-HT <sub>1A</sub> (Ki = 44 $\eta$ M) (Toll <i>et al.</i> , 1998) Agonista pleno 5-HT <sub>1B</sub> (Ki = 66,07 $\eta$ M) (Millan <i>et al.</i> , 2002) Agonista pleno 5-HT <sub>1D</sub> (Ki = 2,69 $\eta$ M) (Hamblin e Metcalf, 1991)
8-OH-DPAT	100 $\mu$ M	Agonista pleno 5-HT <sub>1A</sub> (Ki = 0,57 $\eta$ M) (Newman-Tancredi <i>et al.</i> , 1998) Agonista pleno 5-HT <sub>1D</sub> (Ki = 46,77 $\eta$ M) (Domenech <i>et al.</i> , 1997) Agonista pleno 5-HT <sub>7</sub> (pKi = 251,18 $\eta$ M) (Thomas <i>et al.</i> , 1998)
DOI	100 $\mu$ M	Agonista pleno 5-HT <sub>2A</sub> (Ki = 0,63 - 12,59 $\eta$ M) (Sleight <i>et al.</i> , 1996) Agonista pleno 5-HT <sub>2B</sub> (Ki = 7,08 $\eta$ M) Agonista pleno 5-HT <sub>2C</sub> (Ki = 18,62 $\eta$ M) (Cussac <i>et al.</i> , 2002)
MK-212	100 $\mu$ M	Agonista pleno 5-HT <sub>2B</sub> (Ki = 151,35 $\eta$ M) Agonista pleno 5-HT <sub>2C</sub> (Ki = 891,25 $\eta$ M) (Cussac <i>et al.</i> , 2002)
BW 723C86	100 $\mu$ M	Agonista pleno 5-HT <sub>2a</sub> (Ki = 63,09 $\eta$ M) Agonista pleno 5-HT <sub>2B</sub> (Ki = 46,77 $\eta$ M) Agonista pleno 5-HT <sub>2C</sub> (Ki = 77,62 $\eta$ M) (Knight <i>et al.</i> , 2004)
m-CPP	100 $\mu$ M	Agonista parcial 5-HT <sub>2A</sub> (Ki = 54,95 $\eta$ M) Agonista parcial 5-HT <sub>2B</sub> (Ki = 40,74 $\eta$ M) (Knight <i>et al.</i> , 2004) Agonista parcial 5-HT <sub>2C</sub> (Ki = 3,89 $\eta$ M) (Cussac <i>et al.</i> , 2002)
WAY 161503	100 $\mu$ M	Agonista 5-HT <sub>2A</sub> (Ki = 18,19 $\eta$ M) Agonista 5-HT <sub>2C</sub> (Ki = 3,31 $\eta$ M) (Rosenzweig-Lipson <i>et al.</i> , 2006)

**Quadro 3 - Lista de antagonistas utilizados na caracterização farmacológica de subtipos de receptores serotoninérgicos**

Fármaco	Concentração	Receptores em que atua (Referência)
Ketanserina	1 nM 10 nM 100 nM	Antagonista 5-HT <sub>2A</sub> (Ki = 8,13 nM) Antagonista 5-HT <sub>2B</sub> (Ki = 741,31 nM) Antagonista 5-HT <sub>2C</sub> (Ki = 61,66 nM) (Knight <i>et al.</i> , 2004) Antagonista $\alpha_1$ -adrenérgico (Ki = 72,4 nM) (Korstanje <i>et al.</i> , 1986)
LY 266097	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M	Antagonista 5-HT <sub>2A</sub> (Ki = 19,50) (Audia <i>et al.</i> , 1996) Antagonista 5-HT <sub>2B</sub> (Ki = 0,21 nM) Antagonista 5-HT <sub>2C</sub> (Ki = 93,32 nM) (Cussac <i>et al.</i> , 2002)
Way 100135	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M	Antagonista 5-HT <sub>1A</sub> (Ki = 32,36 nM) (Millan <i>et al.</i> , 1994)
GR 127935	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M	Antagonista 5-HT <sub>1B</sub> (Ki = 1,0 nM) Antagonista 5-HT <sub>1D</sub> (Ki = 2,5 nM) (Gaster <i>et al.</i> , 1998)
Zacopride	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M	Antagonista 5-HT <sub>3</sub> (Ki = 0,38 nM) (Nagakura <i>et al.</i> , 1999) Agonista pleno 5-HT <sub>4</sub> (Ki = 190,55 nM)
SB 269970	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M	Antagonista 5-HT <sub>7</sub> (Ki = 1,26 nM) Antagonista 5-HT <sub>5A</sub> (Ki = 63,09 nM) (Lovell <i>et al.</i> , 2000)

Cada preparação foi utilizada uma única vez com um único fármaco, seja ele agonista ou antagonista. Os agonistas foram administrados em uma única concentração por um período de 15 min para verificar a existência de contração do tecido. Quando antagonistas foram utilizados, o tecido foi previamente incubado por 30 min na presença do antagonista e, posteriormente, uma CCRC (10 nM – 100  $\mu$ M) para serotonina foi realizada. O intervalo entre as doses dentro da CCRC foi de 5 min. Além disso, uma CCRC para 5-HT foi realizada, respeitando os 30 min de incubação, mas sem a adição de nenhum fármaco, e foi utilizada como controle para os grupos.

### 3.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os gráficos e análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prim® versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste *t* de Student ou por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, complementados com o pós teste de Bonferroni, de acordo com cada protocolo experimental. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos

### 3.5 Compostos e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: cetamina e xilazina (Ceva, São Paulo, Brasil); CGS 12066B (dimaleato de 7-trifluormetil-4-(4-metil-1-piperazil)pirrol[1,2-a]-quinoxalina), m-CPP (meta-clorofenilpiperazina), LY 266097 (hidrocloreto de 1-[(2-cloro-3,4-dimetoxifenil)metil]-2,3,4,9-tetrahidro-6-metil-1-H-pirido[3,4-b]indol), WAY 100135 (dihidrocloreto de (S)-N-tert-butil-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazina-1-il)-2-fenilpropanamida), GR 127935 (hidrocloreto de N-[4-metoxi-3-(4-metil-1-piperazinil)fenil]-2'-metil-4'-(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)-1,1'-bifenil-4-carboxamida), hidrocloreto de zacopride, SB 269970 (hidrocloreto de (2R)-1-[3-hidroxifenil]sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)etil]pirrolidina) (ToCris Bioscience, United Kingdom). Hidrocloreto de pargilina (Santa Cruz biotechnology). 5-HT (complexo de sulfato de creatinina 3-[2-aminoetil]-5-hidroxiindol; 5-hidroxitriptamina), hidrocloreto de fluoxetina, atropina, hidrocloreto de buspirona, BW 723C86 (hidrocloreto de  $\alpha$ -metil-5-(2-tienilmetoxi)-1H-indol-3-etanoamina), (R)(-)-DOI (hidrocloreto de ( $\pm$ )-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano), 8-OH-DPAT (hidrobrometo de (R)(+)-2-dipropilamino-8-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno), hidrocloreto de fenilefrina, hidrocloreto de prazosina, sulfato de guanetidina, WAY 161503 (hidrocloreto de 8,9-dicloro-2,3,4,4<sup>a</sup>-tetrahidro-1H-pirazino[1,2-a]quinoxalin-5(6H)-ona, tartarato de ketanserina, MK-212 (hidrocloreto de 2-cloro-6-(1-piperazinil-pirazina), 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético) EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), NaCl (cloreto de sódio), KCl (cloreto de potássio), CaCl<sub>2</sub> (cloreto de cálcio),

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (sulfato de magnésio heptahidratado), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosfato de potássio), NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de sódio), dextrose anidra e DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA).

Os sais utilizados para a preparação da SSF e a maioria das drogas foram diluídos em água destilada, com exceção das seguintes drogas que foram diluídas com auxílio do DMSO (solução final 10%): buspirona, WAY 161503, LY 266097 e 8-OH-DPAT. Essa concentração de DMSO não foi capaz de alterar a resposta contrátil induzida por 5-HT (dados não mostrados).

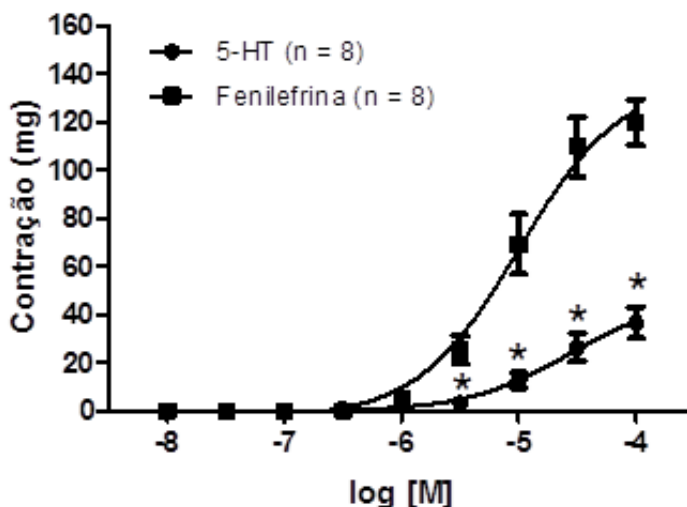
A guanetidina utilizada foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Giles Alexander Rae. A buspirona, o CGS 12066B, 8-OH-DPAT, DOI, MK-212 e m-CPP, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Marino Neto. O 5-HIAA foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Anicleto Poli.

## RESULTADOS

#### 4.1 Avaliação da contração induzida por 5-HT em corpo cavernoso de rato

Com o intuito de avaliar a reatividade contrátil do CC de rato à 5-HT, uma CCRC foi obtida tanto para 5-HT quanto para fenilefrina (para fins de comparação) (**FIGURA 11**). Ambos os fármacos induziram respostas contráteis dependentes de concentração. Como podemos observar a fenilefrina (contração máxima de  $119,90 \pm 9,53$  mg;  $n = 8$ ) foi mais eficaz em induzir contração no CC de rato que a 5-HT (contração máxima de  $32,80 \pm 6,47$  mg;  $n = 8$ ).





**Figura 11 - Curva concentração-resposta cumulativa (CCRC) para 5-HT e fenilefrina em corpo cavernoso de rato.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $10^{-4}$  M) e fenilefrina ( $10^{-8}$  M a  $10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg de contração. \*  $P < 0,05$  quando comparado à fenilefrina (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

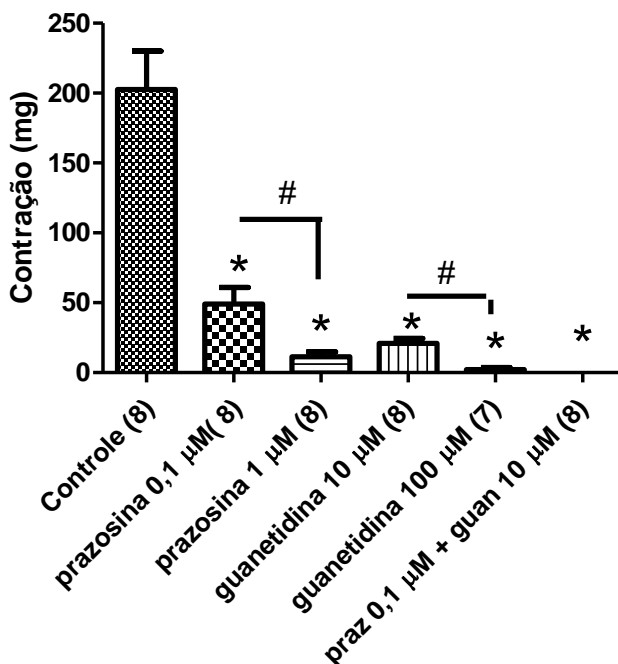
## 4.2 Avaliação da liberação de transmissores contráteis em corpo cavernoso de rato

A EEC causou contração neurogênica em preparações de CC de rato pré-incubadas com L-NAME (100  $\mu$ M) e atropina (1  $\mu$ M) para inibir a influência de fatores de relaxamento (Controle). Alguns tecidos também receberam prazosina (0,1  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M) ou guanetidina (10  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M) isoladamente ou ainda a combinação de ambas prazosina (0,1  $\mu$ M) + guanetidina (10  $\mu$ M), administradas 30 min antes do experimento.

Como podemos observar na **FIGURA 12**, a EEC induziu uma contração de  $202,70 \pm 27,54$  mg ( $n = 8$ ) no grupo controle. A prazosina, um antagonista dos  $\alpha_1$ -adrenoreceptores, utilizada nas concentrações de 0,1  $\mu$ M ( $n = 8$ ) e 1  $\mu$ M ( $n = 8$ ) foi capaz de reduzir a contração para  $49,00 \pm 11,96$  mg e para  $11,44 \pm 3,36$  mg, respectivamente.

Uma resposta semelhante ocorreu quando a guanetidina, um fármaco que atua prevenindo a liberação de noradrenalina, foi utilizada. A resposta foi reduzida para  $20,98 \pm 3,60$  mg na concentração de 10  $\mu$ M e praticamente abolida na concentração de 100  $\mu$ M ( $2,11 \pm 1,51$  mg;  $n = 7$ ).

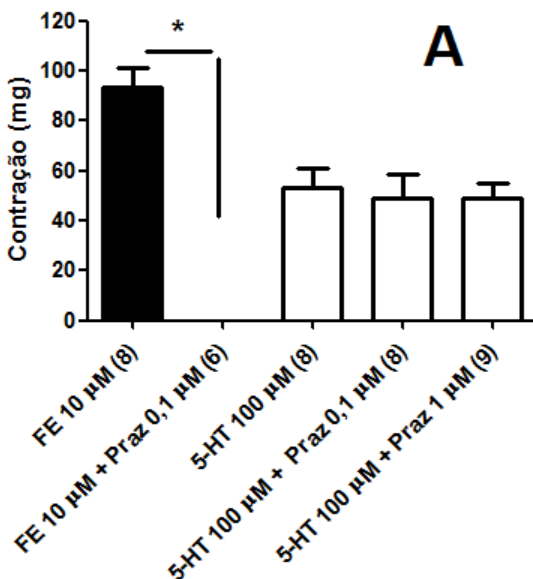
Ao empregar conjuntamente a prazosina e a guanetidina na menor concentração, 0,1 e 10  $\mu$ M respectivamente, a resposta contrátil foi completamente abolida ( $n = 8$ ).



**Figura 12 - Resposta contrátil de tiras de corpo cavernoso isoladas de rato à estimulação elétrica de campo (EEC).** Todos os grupos foram pré-incubados com L-NAME (100 µM) e atropina (1 µM). Com exceção do controle, cada um dos demais grupos recebeu adicionalmente prazosina (100 ηM ou 1 µM), guanetidina (10 µM ou 100 µM) ou prazosina (praz; 0,1 µM) + guanetidina (10 µM). O tempo de incubação foi de 30 min. As barras representam a média ± EPM da contração do CC de rato expressa em mg de contração. \*  $P < 0,05$  vs controle e #  $P < 0,05$  entre os grupos demarcados. (teste t de Student) (n).

É possível que a 5-HT atue em neurônios modulando a liberação da noradrenalina. Dessa forma, a noradrenalina seria a responsável por contrair o CC. No entanto, verificamos que a prazosina foi incapaz de modificar a resposta contrátil à 5-HT exógena (**FIGURA 13**). Quando o CC foi estimulado com 5-HT (100 µM), uma contração de  $53,08 \pm 7,65$  mg (n = 8) foi obtida. Na presença de prazosina 0,1 µM (n = 8) e 1 µM (n = 9), as contrações obtidas foram de  $49,13 \pm 9,44$  mg e  $49,11 \pm 5,98$  mg, respectivamente.

Por outro lado, a prazosina na menor concentração (0,1  $\mu\text{M}$ ;  $n = 6$ ) aboliu a resposta contrátil de  $94,41 \pm 7,64 \text{ mg}$  ( $n = 8$ ) obtida com o uso do agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico fenilefrina (FE) (**FIGURA 13**).



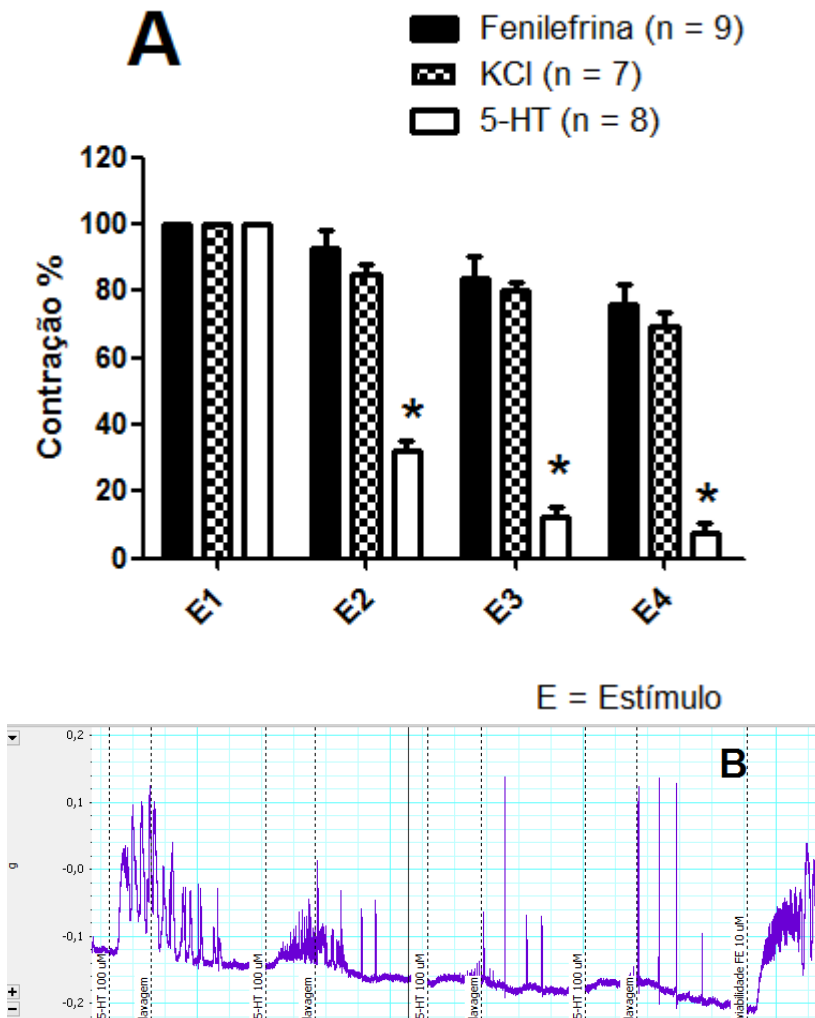
**Figura 13 - Avaliação da resposta contrátil induzida por 5-HT e fenilefrina na presença de prazosina em corpo cavernoso de rato.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Um grupo foi estimulado com o agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico fenilefrina (FE; 10  $\mu\text{M}$ ) na presença e ausência de prazosina (praz; 0,1  $\mu\text{M}$ ). Tiras de CC também foram estimuladas com 5-HT (100  $\mu\text{M}$ ) na presença e ausência de prazosina (0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ ). As barras representam a média  $\pm$  EPM da contração obtida em mg. \*  $P < 0,05$  vs. Controle. (Teste de Student) (n).

#### 4.3 Avaliação da reprodutibilidade do perfil contrátil do corpo cavernoso e da veia dorsal peniana a agentes contráteis

Também verificamos a reprodutibilidade da resposta contrátil induzida por 5-HT no CC (**FIGURA 14**) e na VDP (**FIGURA 15**) de rato. Para tal, o CC e a VDP foram estimulados quatro vezes consecutivas com 5-HT (100  $\mu\text{M}$ ) ou fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ); o CC foi estimulado também com KCl (80 mM). Cada tecido foi estimulado com o fármaco durante 15 min e, entre os estímulos, o meio foi trocado

repetidas vezes durante 35 min, tempo necessário para o retorno à linha basal. A contração induzida pela primeira aplicação do agente contrátil foi considerada como 100 % e as demais como porcentagem desta resposta.

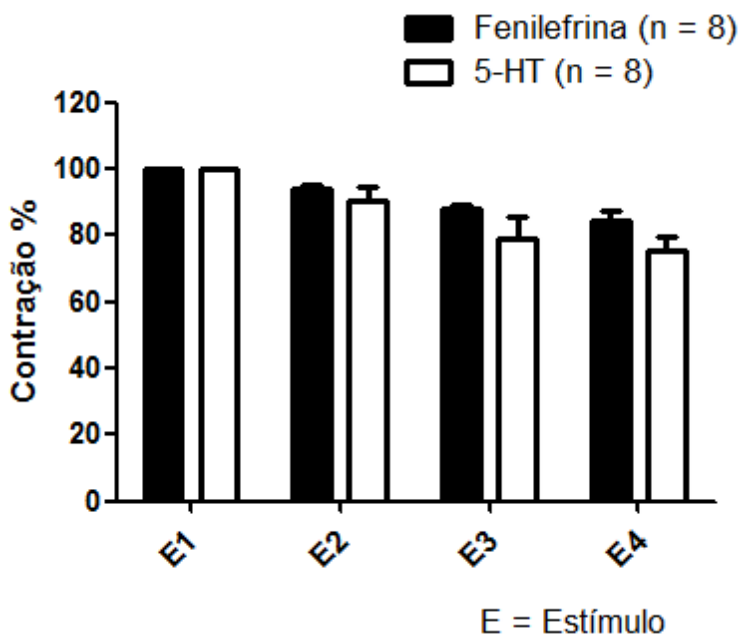
Pode-se observar que no CC (**FIGURA 14**) há uma queda de resposta semelhante nos grupos estimulados com fenilefrina ou KCl, apresentando uma resposta de  $93 \pm 5,4$  %,  $84 \pm 6,5$  % e  $76 \pm 6,1$  % da contração inicial para fenilefrina ( $n = 9$ ) nos estímulos E2, E3 e E4, respectivamente; e de  $85 \pm 2,6$  %,  $80 \pm 2,6$  % e  $69 \pm 4,0$  % da contração inicial para KCl ( $n = 7$ ) nos estímulos E2, E3 e E4, respectivamente. Quando estimulado com 5-HT ( $n = 8$ ), a queda de resposta contrátil foi de  $32 \pm 2,9$  % da resposta inicial em E2 e de  $12 \pm 3,3$  % e  $7 \pm 3,0$  %, em E3 e E4, respectivamente. Importante observar na **FIGURA 14 B**, que após os quatro estímulos com 5-HT, a preparação ainda é capaz de contrair na presença de fenilefrina  $10 \mu\text{M}$ .



**Figura 14 - Reprodutibilidade da resposta contrátil em corpo cavernoso de rato quando estimulados com 5-HT (100  $\mu$ M), fenilefrina (10  $\mu$ M) e KCl (80 mM) (A) e um registro típico da estimulação por 4 vezes com 5-HT seguida de estimulação com fenilefrina (B). Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. O primeiro estímulo (E1) foi considerado como 100% de contração, o segundo, terceiro e quarto (E2, E3 e E4, respectivamente) foram representados como porcentagem do E1. As barras representam a média  $\pm$  EPM da contração obtida medida em porcentagem de**

E1. \*  $P < 0,05$  estímulo (E) para 5-HT vs E para fenilefrina e KCl (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de BONFERRONI).

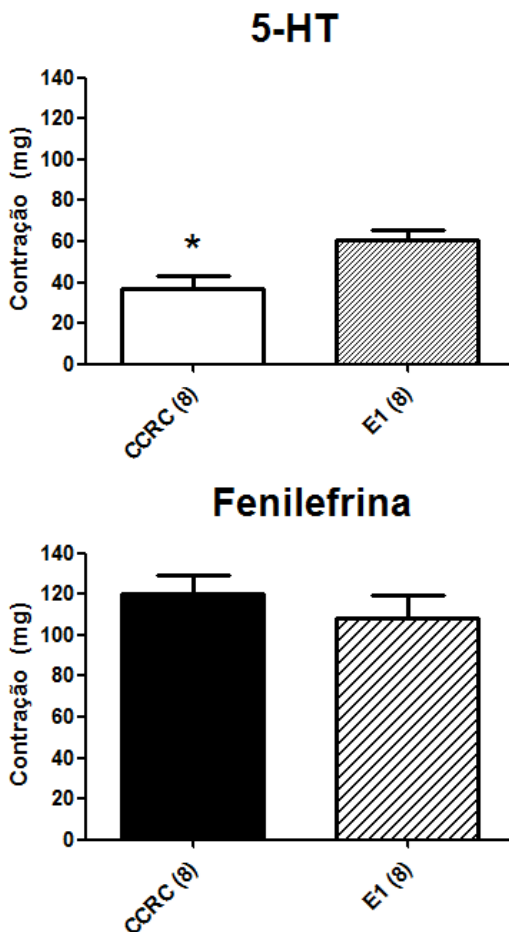
De modo semelhante ao CC, quando a VDP foi estimulada quatro vezes com fenilefrina ( $n = 8$ ) (**FIGURA 15**), houve uma queda na resposta contrátil ao longo dos estímulos quando comparado ao primeiro estímulo (E1). As contrações obtidas para a fenilefrina em E2, E3 e E4 foram de  $94 \pm 1,1 \%$ ,  $88 \pm 1,5 \%$  e  $84 \pm 3 \%$ , respectivamente. Diferentemente do observado no CC, a queda da resposta contrátil quando estimulada por 5-HT ( $n = 8$ ) foi semelhante àquela observada para fenilefrina, sendo as contrações de E2, E3 e E4 de  $91 \pm 3,8 \%$ ,  $79 \pm 6,5 \%$  e  $76 \pm 4,2 \%$ , respectivamente.



**Figura 15 - Reprodutibilidade da resposta contrátil da veia dorsal peniana de rato a adições repetidas de 5-HT (100  $\mu$ M) e fenilefrina (10  $\mu$ M).** Anéis de VDP foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. A resposta à primeira exposição (E1) foi considerada como 100% de contração, e as demais (E2, E3 e E4) são representadas como porcentagem de E1. As barras representam a média  $\pm$  EPM da contração obtida medida em porcentagem de E1. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de BONFERRONI).

A resposta contrátil obtida pela adição de 5-HT e fenilefrina na concentração de  $100\text{ }\mu\text{M}$  na CCRC foi comparada com aquela induzida por mesma concentração administrada isoladamente (E1) (**FIGURA 16**). Quando o CC de rato foi estimulado uma única vez com 5-HT a resposta contrátil foi de  $60 \pm 5,1\text{ mg}$ . No entanto, na CCRC a resposta obtida foi de  $37 \pm 6,5\text{ mg}$ , ou seja, 62% da obtida na E1, demonstrando uma perda de resposta contrátil durante o desenvolvimento da CCRC. Essa perda de resposta não foi observada quando o agente contrátil utilizado foi a fenilefrina, onde a resposta obtida na E1 ( $108 \pm 11,7\text{ mg}$ ) foi semelhante àquela obtida na CCRC de ( $120 \pm 9,5\text{ mg}$ ).

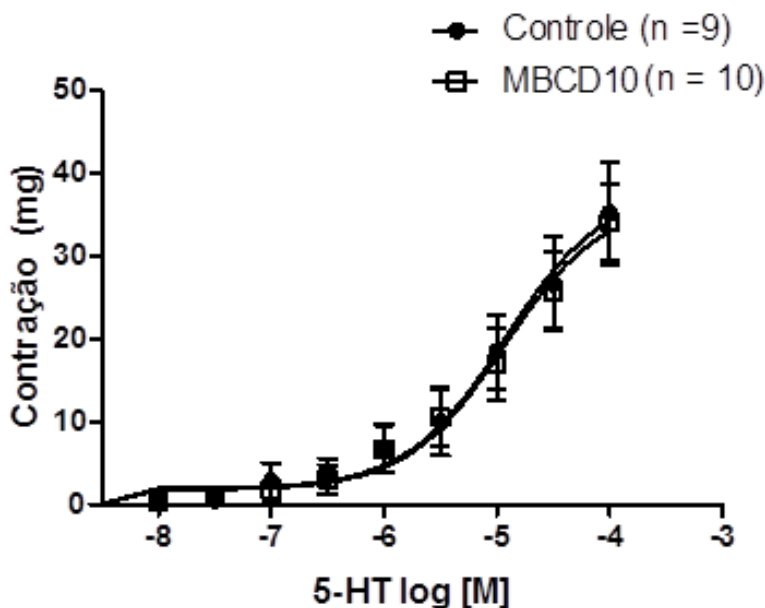




**Figura 16 - Comparação da contração obtida em corpo cavernoso de rato quando estimulado com 5-HT ou fenilefrina uma única vez (E1; 100  $\mu$ M) com a contração obtida, em mesma concentração, na curva concentração-resposta cumulativa.** Tiras de CC foram montadas em cuba para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. As barras representam a média  $\pm$  EPM da contração obtida em mg. \*  $P < 0,05$  entre os grupos CCRC e E1 (Teste t de Student) (n).

#### 4.4 Participação das caveolas na resposta taquifilática induzida por 5-HT

Para verificar se as caveolas estão envolvidas no processo de perda de dessensibilização da resposta contrátil do CC de rato frente à 5-HT, tiras de CC foram incubadas com M $\beta$ CD (10 mM) durante 60 min e uma CCRC foi desenvolvida (**FIGURA 17**). Nenhuma diferença foi observada tanto no desenvolvimento da CCRC, quanto nos valores de pD<sub>2</sub> e nos valores de contração máxima (**TABELA 1**) quando comparado com uma CCRC obtida na ausência de M $\beta$ CD (controle).



**Figura 17 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de M $\beta$ CD.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de M $\beta$ CD (10 mM) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

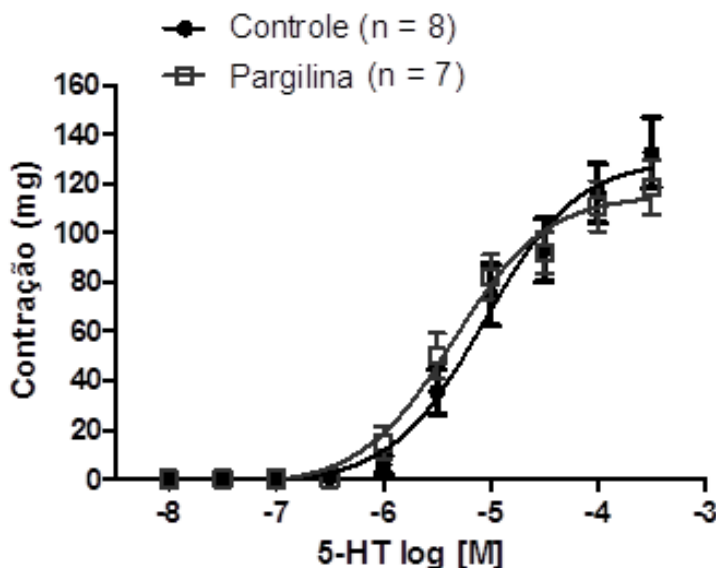
**Tabela 1 - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de MβCD em CC de rato**

<i>Tratamento</i>	<i>pD2 ± EPM</i>	<i>Contração ± EPM (mg)</i>
Veículo	4,93 ± 0,22 (9)	38,00 ± 4,93 (9)
MβCD 10 mM	4,93 ± 0,19 (10)	36,65 ± 4,14 (10)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (teste t de Student) (n).]

#### 4.5 Influência da captação e do metabolismo da 5-HT na resposta contrátil do corpo cavernoso de rato

Para verificar se a metabolização da 5-HT, através da MAO, altera a resposta contrátil induzida por 5-HT, o CC de rato foi incubado com um inibidor da MAO, a pargilina (100 μM), por 30 min e, em seguida, curvas CCRC para 5-HT foram realizadas. Algumas tiras de CC foram estimuladas com única concentração de 5-HT (100 μM) 30 min após a administração de pargilina (100 μM). Podemos observar na **FIGURA 18** que a pargilina não alterou a CCRC induzida por 5-HT. Os valores de pD2 e de contração máxima (**TABELA 2**) não foram diferentes entre as duas curvas. A presença de pargilina também não alterou a contração induzida por 5-HT 100 μM (**FIGURA 19**).

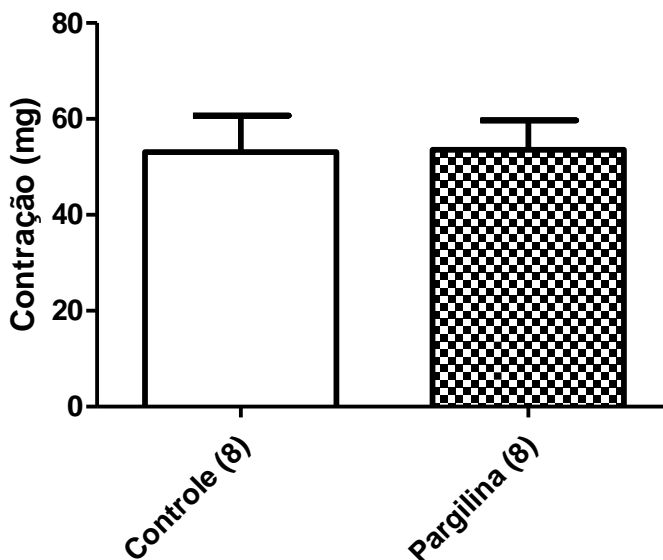


**Figura 18 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na presença e ausência de pargilina em CC de rato.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de pargilina ( $100 \mu\text{M}$ ) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

**Tabela 2 - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de pargilina em corpo cavernoso de rato**

Tratamento	pD2 $\pm$ EPM	Contração $\pm$ EPM (mg)
Veículo (8)	5,06 $\pm$ 0,11	130,00 $\pm$ 6,93
Pargilina 100 $\mu\text{M}$ (7)	5,35 $\pm$ 0,10	115,70 $\pm$ 4,90

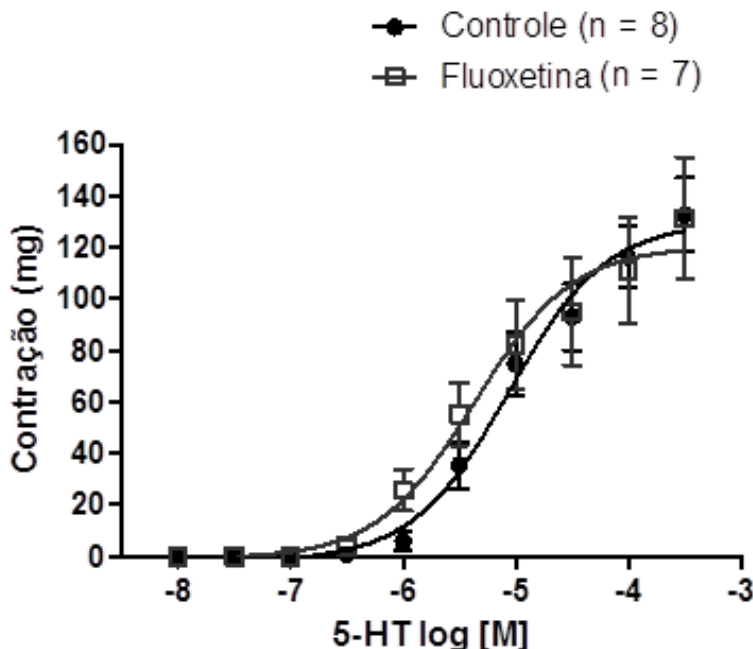
Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (teste t de Student) (n).



**Figura 19 - Avaliação da resposta contrátil induzida por 5-HT na ausência e na presença de pargilina em corpo cavernoso de rato.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. As preparações foram estimuladas com 5-HT (100  $\mu$ M) na ausência (controle) e na presença de pargilina (100  $\mu$ M) administrada 30 min antes da 5-HT. As barras representam a média  $\pm$  EPM da contração obtida em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (Teste t de Student) (n).

Além disso, a resposta contrátil para 5-HIAA (100  $\mu$ M) também foi avaliada e verificamos que diferentemente da 5-HT, o 5-HIAA foi incapaz de gerar contração do CC de rato (dados não mostrados).

Para avaliar a capacidade de um ISRS interferir na resposta contrátil do CC de rato, uma CCRC para 5-HT na presença de fluoxetina (1  $\mu$ M) foi realizada (**FIGURA 20**). A CCRC para 5-HT não foi alterada na presença de fluoxetina. Os valores de pD2 e de contração máxima (**TABELA 3**) foram semelhantes em CCRC realizadas na presença e ausência de fluoxetina.



**Figura 20 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de fluoxetina em corpo cavernoso de rato.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de fluoxetina (1  $\mu$ M) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

**Tabela 3 - Valores de  $pD_2$  e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de fluoxetina em CC de rato**

Tratamento	$pD_2 \pm EPM$	Contração $\pm EPM$ (mg)
Veículo (8)	$5,06 \pm 0,11$	$130,00 \pm 6,93$
Fluoxetina 1 $\mu$ M (7)	$5,37 \pm 0,18$	$120,50 \pm 9,40$

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (teste t de Student) (n).

#### 4.6 Caracterização farmacológica dos receptores serotoninérgicos envolvidos na contração do corpo cavernoso de rato

Como observado na **TABELA 4**, entre os diversos agonistas de receptores serotoninérgicos utilizados na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , somente o 8-OH-DPAT, agonista seletivo para receptores 5-HT<sub>1A</sub> com moderada afinidade por 5-HT<sub>7</sub>, foi capaz de induzir uma resposta contrátil de  $20,77 \pm 9,32$  mg ( $n = 7$ ) no CC de rato. Essa resposta é 1/3 daquela obtida com 5-HT 100  $\mu\text{M}$  ( $60 \pm 5,1$  mg de contração).

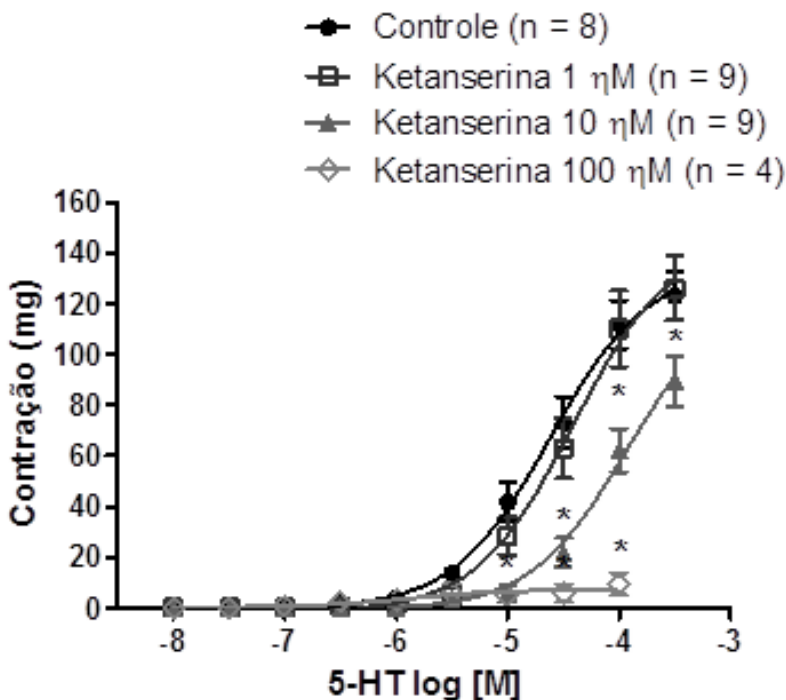
**Tabela 4 – Resposta contrátil induzida por agonistas serotoninérgicos em CC de rato**

<i>Agonista serotoninérgico</i>	<i>Contração obtida em estímulo único (100 <math>\mu\text{M}</math>)</i>
<b>Buspirona</b>	Sem efeito ( $n = 4$ )
<b>CGS</b>	Sem efeito ( $n = 4$ )
<b>8-OH-DPAT</b>	$20,77 \pm 9,32$ mg ( $n = 7$ )
<b>DOI</b>	Sem efeito ( $n = 4$ )
<b>MK-212</b>	Sem efeito ( $n = 4$ )
<b>BW 723C86</b>	Sem efeito ( $n = 4$ )
<b>m-CPP</b>	Sem efeito ( $n = 4$ )
<b>WAY 161503</b>	Sem efeito ( $n = 4$ )

Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Antagonistas de receptores serotoninérgicos também foram utilizados para a caracterização farmacológica do receptor envolvido na contração induzida por 5-HT em CC de rato. Os CC foram incubados por um período de 30 min com o antagonista antes da realização da CCRC para 5-HT.

A **FIGURA 21** exibe a CCRC para 5-HT na presença de ketanserina, um fármaco de ação inibitória dos receptores 5-HT<sub>2</sub>. Observa-se que na presença de ketanserina 1  $\eta\text{M}$ , a CCRC obtida foi semelhante a do grupo controle (ausência de ketanserina). Quando a concentração de ketanserina aumentou para 10  $\eta\text{M}$ , observamos que a CCRC foi deslocada para a direita; que os valores de pD<sub>2</sub> e de contração máxima (**TABELA 5**) foram menores na presença de ketanserina quando comparado ao controle.



**Figura 21 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de ketanserina.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de ketanserina (1, 10 e 100  $\mu$ M) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. \*  $P < 0,05$  vs. controle (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

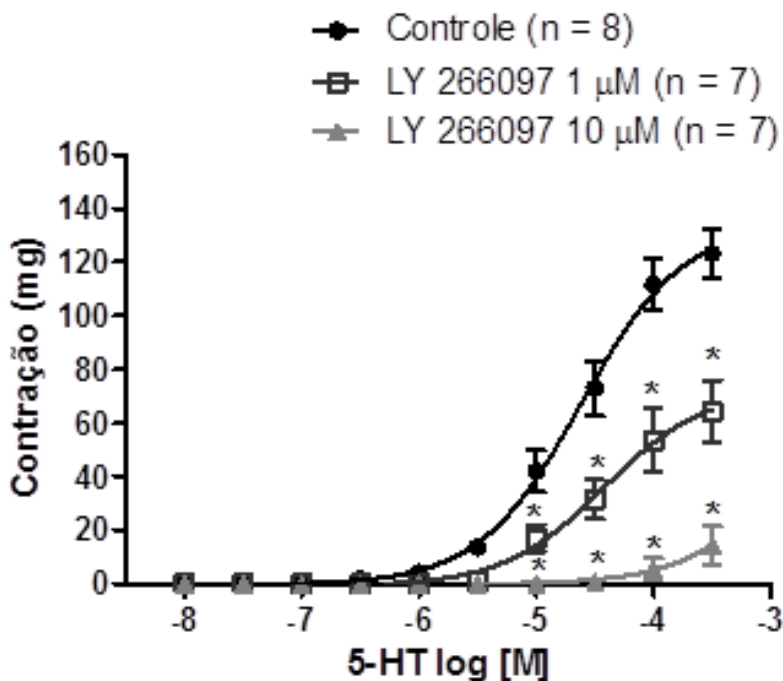
**Tabela 5 - Valores de  $pD_2$  e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de ketanserina em CC de rato**

Tratamento	$pD_2 \pm EPM$	Contração $\pm EPM$ (mg)
Veículo (8)	$4,62 \pm 0,08$	$134.30 \pm 6,38$
Ketanserina 1 $\mu$ M (9)	$4,42 \pm 0,11$	$145.00 \pm 10,13$
Ketanserina 10 $\mu$ M (9)	$3,94 \pm 0,12$ *	$124.80 \pm 13,14$

\*  $P < 0,05$  vs. controle (teste t de Student) (n).



Além da ketanserina, outro antagonista de receptores da família 5-HT<sub>2</sub>, com maior seletividade para o 5-HT<sub>2B</sub>, o LY 266097 também foi capaz de reduzir os efeitos contráteis da 5-HT em CC de rato de modo concentração dependente. Quanto maior a concentração de LY 266097, menor foi a resposta contrátil obtida pela 5-HT (**FIGURA 22**). As variações no pD<sub>2</sub> e nos valores de contração máxima estão demonstrados nas **TABELA 6**.



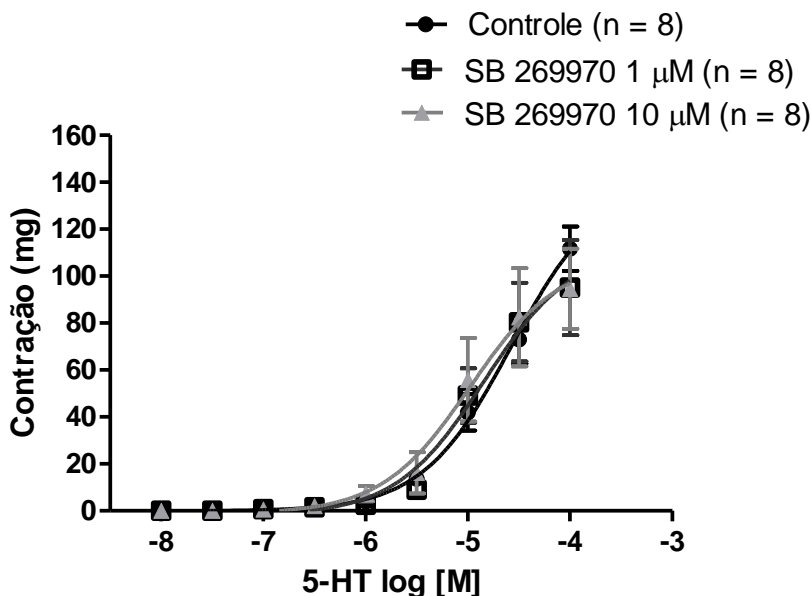
**Figura 22 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de LY 266097.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de LY 266097 (1 e 10  $\mu$ M) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. \*  $P < 0,05$  vs. controle (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

**Tabela 6 - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de LY 266097 em CC de rato**

<i>Tratamento</i>	<i>pD2 ± EPM</i>	<i>Contração ± EPM (mg)</i>
Veículo (8)	4,62 ± 0,08	134.30 ± 6,38
LY 266097 1 µM (7)	4,42 ± 0,16	72.97 ± 7,79 *
LY 266097 10 µM (7)	-----	-----

\*  $P < 0,05$  vs. controle (teste t de Student) (n).

Os antagonistas que não apresentaram alteração na resposta contrátil na CCRC, no pD2 ou na contração máxima são os seguintes: SB 269970 (**FIGURA 23; TABELA 7**), um potente e seletivo antagonista 5-HT<sub>7</sub>, com certa seletividade como antagonista 5-HT<sub>5A</sub> e 5-HT<sub>1B</sub>; zacopride (**FIGURA 24; TABELA 8**), um potente antagonista 5-HT<sub>3</sub> com certa atividade de agonista dos receptores 5-HT<sub>4</sub>; WAY 100135 (**FIGURA 25; TABELA 9**), um potente e seletivo antagonista 5-HT<sub>1A</sub> com pequena atividade como antagonista sobre 5-HT<sub>1B/1C/2</sub>,  $\alpha$ -adrenérgicos e dopaminérgicos D<sub>2</sub>; e GR 127935 (**FIGURA 26; TABELA 10**), potente e seletivo antagonista 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> com baixa seletividade para 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, e 5-HT<sub>2C</sub>.

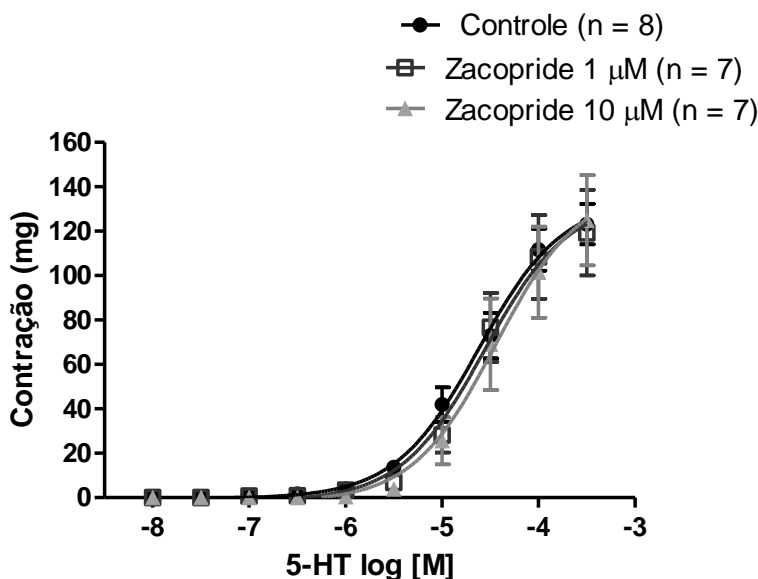


**Figura 23 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de SB 269970.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de SB 269970 (1 e 10  $\mu$ M) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

**Tabela 7 - Valores de pD<sub>2</sub> e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de SB 269970 em CC de rato**

Tratamento	pD <sub>2</sub> $\pm$ EPM	Contração $\pm$ EPM (mg)
Veículo (8)	4,58 $\pm$ 0,10	140,00 $\pm$ 11,66
SB 269970 1 $\mu$ M (8)	4,84 $\pm$ 0,18	112,40 $\pm$ 14,07
SB 269970 10 $\mu$ M (8)	4,97 $\pm$ 0,21	107,40 $\pm$ 13,99

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (teste t de Student) (n).

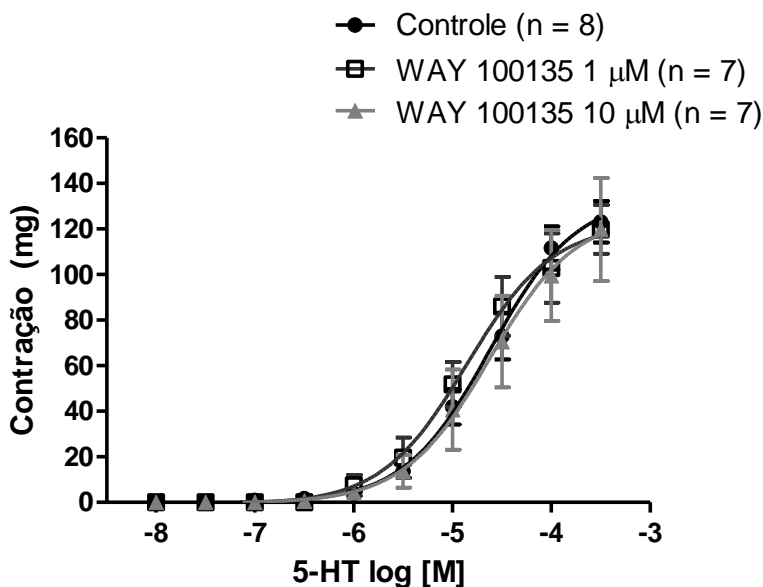


**Figura 24 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de zacopride.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de zacopride (1 e 10  $\mu$ M) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

**Tabela 8 - Valores de  $pD_2$  e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de zacopride em CC de rato**

Tratamento	$pD_2 \pm EPM$	Contração $\pm EPM$ (mg)
Veículo (8)	$4,62 \pm 0,08$	$134,30 \pm 6,38$
Zacopride 1 $\mu$ M (7)	$4,56 \pm 0,14$	$134,00 \pm 11,54$
Zacopride 10 $\mu$ M (7)	$4,44 \pm 0,16$	$139,90 \pm 14,90$

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (teste t de Student) (n).

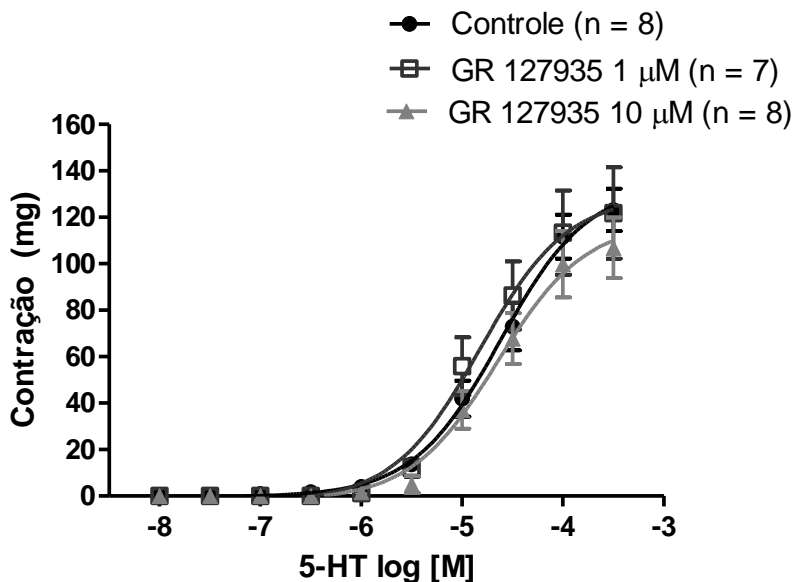


**Figura 25 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de WAY 100135.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de WAY 100135 (1 e 10  $\mu$ M) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

**Tabela 9 - Valores de pD2 e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de WAY 100135 em CC de rato**

<i>Tratamento</i>	<i>pD2 <math>\pm</math> EPM</i>	<i>Contração <math>\pm</math> EPM (mg)</i>
Veículo (8)	4,62 $\pm$ 0,08	134,30 $\pm$ 6,38
Way 100135 1 $\mu$ M (7)	4,85 $\pm$ 0,12	122,40 $\pm$ 7,43
Way 100135 10 $\mu$ M (7)	4,62 $\pm$ 0,19	126,50 $\pm$ 13,72

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (teste t de Student) (n).



**Figura 26 - Curva concentração-resposta cumulativa para 5-HT na ausência e na presença de GR 127935.** Tiras de CC foram montadas em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de 5-HT ( $10^{-8}$  M a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram adicionadas às preparações na ausência (controle) ou na presença de GR 127935 (1 e 10  $\mu$ M) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da tensão mensurada em mg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de BONFERRONI).

**Tabela 10 - Valores de  $pD_2$  e de contração máxima obtidos na CCRC para 5-HT na ausência e na presença de GR 127935 em CC de rato**

Tratamento	$pD_2 \pm EPM$	Contração $\pm EPM$ (mg)
Veículo (8)	$4,62 \pm 0,08$	$134,30 \pm 6,38$
GR 127935 1 $\mu$ M (7)	$4,82 \pm 0,14$	$129,40 \pm 9,54$
GR 127935 10 $\mu$ M (8)	$4,65 \pm 0,12$	$118,00 \pm 8,03$

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (teste t de Student) (n).



### 5.1 O papel da 5-HT e da noradrenalina na contração do corpo cavernoso de rato

Tanto Erspamer (1930) quanto Rapport *et al.* (1948) demonstraram a capacidade da 5-HT gerar contração de musculatura lisa e modular o tônus vascular. Trabalhos posteriores, como os de Furukawa et al. (2003) e Lau et al. (2006), utilizando sistemas para órgão isolado para medidas de tensão isométrica semelhantes ao utilizado neste trabalho, demonstraram que a 5-HT é capaz de contrair tiras de CC de coelhos e de humanos, respectivamente. Apesar disso, é atribuído à noradrenalina o papel de ser o principal mediador da contração do CC de humanos (Traish *et al.*, 1999) e, desta forma, manter o pênis em seu estado flácido. Essas respostas contráteis foram reproduzidas em CC de rato (**FIGURA 11**), onde se verifica uma contração dependente de concentração tanto para 5-HT quanto para o agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina. Observa-se ainda que a resposta contrátil foi mais robusta quando o CC foi estimulado com fenilefrina em comparação à obtida com 5-HT.

Além de demonstrar que a 5-HT é capaz de contrair o CC de rato, também foi avaliada a liberação de neurotransmissores contráteis, em especial a noradrenalina e a 5-HT, por meio de protocolos com estímulo elétrico de campo (EEC). Nesses protocolos, a estimulação elétrica causou despolarização de neurônios intracavernosos e, dessa forma, a liberação dos neurotransmissores. Nossos resultados (**FIGURA 12**) demonstram que tanto a prazosina, um antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, quanto a guanetidina, um fármaco capaz de impedir a neurotransmissão noradrenérgica, diminuíram consideravelmente, chegando em alguns protocolos a abolir, a contração observada no grupo controle. Estes resultados reforçam a majoritária participação da noradrenalina, que quando liberada por neurônios ativa os  $\alpha_1$ -adrenoreceptores presentes nas células musculares lisas induzindo contração. Além disso, a inexistência ou pouca resposta contrátil com o uso desses fármacos favorece a ideia de que é pouco provável que outros neurotransmissores capazes de induzir contração do CC de rato, como a 5-HT, sejam liberados pelos neurônios intracavernosos. Esses resultados vão ao encontro dos obtidos por Finberg e Vardi, em 1990. Estes autores verificaram que tanto a metiopemina, um antagonista serotoninérgico, quanto a clomipramina, um antidepressivo tricíclico, foram incapazes de alterar a frequência-resposta em protocolos de estimulação espinal e sugeriram a ausência de inervação serotoninérgica no CC de rato.



Uma ressalva é preciso ser feita ao analisar os resultados obtidos pelo uso da guanetidina. Este fármaco, ao impedir a liberação da noradrenalina, pode também impedir a co-liberação de outras moléculas que estejam vesiculadas junto da noradrenalina as quais podem ter participação no processo contrátil. Outro ponto experimental importante a ser citado é de que a abolição da resposta contrátil com o uso de prazosina e guanetidina demonstra que a EEC aplicada no CC de rato é incapaz de ativar diretamente as células musculares lisas, pois se assim o fosse, provavelmente haveria contração tecidual mesmo na presença desses compostos.

Apesar de os resultados com estimulação elétrica demonstrarem pouca ou nenhuma liberação de 5-HT através da inervação intracavernosa em CC de rato, Lau *et al.* (2006), sugeriram o contrário em experimentos com CC de humanos. Estes autores, através da EEC, observaram uma perda de resposta contrátil em tiras de CC de humanos quando pré-incubadas com ketanserina, um antagonista serotoninérgico, na concentração de 10  $\mu$ M quando comparada ao grupo controle (sem ketanserina). A ketanserina também é um antagonistas dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Zabludowski *et al.*, 1985), possuindo uma constante de inibição ( $K_i$ ) de 72,4  $\eta$ M para estes receptores (Korstanje *et al.*, 1986). É portanto, provável que a ketanserina, na concentração utilizada por Lau *et al.* (2006) também tenha antagonizado os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, gerando a perda de resposta contrátil observada. Analisando deste modo, é possível que assim como observamos em ratos, em humanos a 5-HT também não seja liberada pelos neurônios cavernosos.

Apesar disso, a serotonina poderia atuar modulando a liberação de noradrenalina, e com isso gerar uma contração indireta do CC de rato. Se essa hipótese fosse verdadeira, ao se incubar o CC de rato com prazosina e estimulá-lo com 5-HT exógena (**FIGURA 12**) a contração seria diminuída ou mesmo abolida. No entanto, a resposta contrátil permaneceu inalterada. Esse resultado mostra, inicialmente, que a 5-HT não parece modular diretamente a liberação de noradrenlina por parte dos neurônios intracavernosos. E, em segunda análise, reforça a ideia de que há na musculatura lisa do CC sistemas capazes de responder com contração ao estímulo com 5-HT.

Essa ideia da 5-HT modulando a transmissão noradrenérgica já foi demonstrada por diversos pesquisadores, entre eles podemos citar o trabalho de Gorea e Adrien (1988). Esses autores desenvolveram o seguinte experimento: identificaram no loco cerúleo neurônios adrenérgicos e verificaram as descargas que ocorriam nesses neurônios

através da administração de diversos fármacos. Dentre os fármacos utilizados, a quipazina, um agonista serotoninérgico não seletivo, e o DOB, um agonista seletivo 5-HT<sub>2</sub>, reduziram a frequência de disparo dos neurônios noradrenérgicos. De modo contrário, a ketanserina preveniu ou reverteu esses efeitos, sugerindo a participação do sistema serotoninérgico no controle da liberação de noradrenalina. Outro trabalho objetivando verificar a influência da 5-HT na liberação neuronal de noradrenalina foi realizado por Done e Sharp (1994). Por meio de uma sonda de microdiálise aplicada no hipocampo de ratos e utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), esses pesquisadores conseguiram avaliar os níveis de noradrenalina nessa estrutura após a administração de diversos fármacos por via intracutânea. Ao administrarem 8-OH-DPAT, buspirona, NAN-190 e MDL 73005EF, agonistas com seletividade para o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, eles observaram que houve um incremento no efluxo de noradrenalina. Esse aumento do efluxo de noradrenalina também foi observado quando fármacos com atividade antagonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, como a ritanserina e o ICI 170809, foram utilizados. Desta forma, apesar da 5-HT ser capaz de modular a neurotransmissão noradrenérgica no SNC, isso parece não ocorrer no CC de rato.

## 5.2 A contração do corpo cavernoso de rato induzida por 5-HT

Independentemente da existência ou não de inervação serotoninérgica, o maior estoque de 5-HT do corpo são as plaquetas e sendo o CC uma estrutura formada por sinusóides preenchidos com sangue, é possível que ocorra a liberação da 5-HT presente nas plaquetas junto ao CC. Alguns trabalhos chegam a comparar as plaquetas com sinaptossomos, devido à semelhança de muitas propriedades entre essas estruturas, tais quais o transporte e armazenamento da 5-HT em grânulos e a sua degradação pela MAO (Modai *et al.*, 1979). Além disso, sabe-se que a ativação plaquetária induz a liberação de 5-HT. A ativação plaquetária é geralmente induzida por ADP, adrenalina, colágeno e, em menor escala, pela própria 5-HT, a qual além de ativar a plaqueta, exerce um efeito modulador (retroalimentação; feedback), controlando a própria liberação de 5-HT pelas plaquetas (Lin *et al.*, 2014).

De acordo com os nossos resultados é possível observar (**FIGURA 13**) um papel clássico da 5-HT, o de ser um agente contrátil em musculatura lisa, onde, de modo concentração-dependente, foi capaz de contrair o CC de rato. Entretanto, a contração induzida por 5-HT não

foi reproduzida ao longo de vários estímulos (**FIGURA 14**); processo conhecido por taquifilaxia. Cohen *et al.* (1968) definem taquifilaxia como o desenvolvimento de tolerância a um determinado fármaco após repetidas administrações. Pode-se ainda observar que a resposta contrátil máxima na CCRC para 5-HT foi menor do que aquela obtida quando houve um único estímulo com 5-HT, sugerindo que durante a construção da CCRC ocorreu dessensibilização (**FIGURA 15**).

A taquifilaxia em CC para 5-HT não é um mecanismo que ocorre exclusivamente em ratos. Esse fenômeno também foi observado em CC de humanos e descrito por Lau *et al.* (2006), mas aparentemente não é verificado em coelhos, como se deduz do trabalho de Furukawa *et al.* (2003). Estes pesquisadores, de modo semelhante ao que desenvolvemos, retiraram e dissecaram CC de coelhos e os montaram em cubas para análise de tensão isométrica. As tiras permaneceram em meio a uma solução nutritiva com temperatura controlada e aerada com mistura carbogênica, como em nossos experimentos. Após a estabilização do tecido e a verificação de sua viabilidade, quatro CCR foram desenvolvidas para 5-HT (0,1  $\mu$ M até 1 mM) com intervalo de 1 h entre cada curva. Com esse experimento, de modo oposto ao que foi verificado em CC de humano por Lau *et al.* (2006) e por nós em CC rato, Furukawa *et al.* não observaram diferenças significativas entre as quatro curvas, sugerindo a inexistência de mecanismos de dessensibilização pra 5-HT no CC de coelho. Esse ponto é importante pois traz à discussão que diferenças interespecies podem existir e que a extrapolação de um resultado obtido em uma espécie nem sempre pode ser feita para outras espécies sem os devidos cuidados. No entanto, o tempo de uma hora entre as curvas pode ter sido suficiente para que os efeitos taquifiláticos fossem revertidos, lembrando que nossos protocolos tiveram tempo entre cada estímulo de 35 min e os de Lau e colaboradores, de 30 min.

Além de ocorrer em outras espécies, a taquifilaxia frente ao estímulo repetido com 5-HT parece ser um fenômeno comum para os receptores serotoninérgicos. Trabalhos como o de López-Tudanca *et al.* (2003) demonstraram a existência de resposta taquifilática com dessensibilização de receptores 5-HT<sub>3</sub> em coração de rato. Sanders-Bush (1990) sugere que após uma exposição prolongada à 5-HT ou aos seus agonistas, os receptores da família 5-HT<sub>2</sub> sofrem um processo de dessensibilização. Ainda, dentro de uma mesma família, Briddon *et al.* (1998) demonstraram que os mecanismos de dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> são diferentes.

Uma das várias possibilidades da resposta taquifilática ocorrer se dá através da internalização de receptores por intermédio das caveolas. As caveolas são pequenas invaginações da membrana ricas em colesterol, glicoesfingolipídeos e caveolinas (proteínas estruturais) (Anderson, 1998). Utilizando a M $\beta$ CD, um composto capaz de sequestrar o colesterol, Linder *et al.* (2007) conseguiram reverter uma resposta taquifilática gerada em aorta de rato com o uso de angiotensina II. Estes autores observaram, através de microscopia eletrônica, que a M $\beta$ CD causou um desarranjo das caveolas em aorta de rato.

As caveolas também foram observadas em CC de rato por Bakircioglu *et al.* (2001) e por Linder *et al.* (2006). Estes pesquisadores utilizaram a M $\beta$ CD para causar o desarranjo das caveolas presentes no CC de rato. Observamos em nossos experimentos que o desarranjo das caveolas com o uso de M $\beta$ CD não alterou a CCRC para 5-HT (**FIGURA 17**), nem os valores de pD2 e de contração máxima (**TABELA 1**), sugerindo que as caveolas não são importantes para a taquifilaxia observada. Existem várias outras possibilidades para que a dessensibilização ocorra que precisam ainda ser estudadas, como a internalização de receptores por meio de vesículas revestidas por clatrina com envolvimento da  $\beta$ -arrestina. Nesse processo, após ser ativado, o receptor é fosforilado por proteínas quinases e então há o recrutamento da  $\beta$ -arrestina a qual forma um complexo com o receptor. Após isso, as clatrininas são recrutadas e ocorre a endocitose do receptor (Pierce e Lefkowitz, 2001; Houndolo *et al.*, 2005).

Dado que o sangue chega ao CC por meio de artérias e retorna ao corpo, principalmente pela VDP, a capacidade da 5-HT em gerar uma resposta taquifilática também foi avaliada para a VDP. O trabalho de De Lima e Silva (2013) demonstrou que a VDP é capaz de contrair na presença da 5-HT e também de captá-la e metabolizá-la. Diferentemente do que vimos em CC de rato, a VDP (**FIGURA 15**) não apresentou resposta taquifilática quando estimulada com 5-HT. Esses achados são interessantes, pois na dinâmica da ereção peniana, para que ela ocorra, é necessário a dilatação do CC e a veno-oclusão da VDP; sendo que a vasoconstricção gerada pela 5-HT pode atuar como um mecanismo auxiliar do processo mecânico de veno-oclusão. Esses resultados sugerem que o CC de rato ao ser estimulado continuamente pela 5-HT perde sua capacidade de contrair (resposta taquifilática), facilitando a sua dilatação, ou seja, a ereção. Em contraponto, a capacidade da VDP de contrair frente à 5-HT é mantida, dificultando que o retorno venoso, auxiliando assim na manutenção do sangue dentro do corpo cavernoso, ou seja, auxiliando a própria ereção. Analisando esses dois pontos

conjuntamente, a 5-HT parece atuar localmente de modo a facilitar a ereção.

A via mais comum de atuação da 5-HT em algum tecido é pela ativação de seus receptores. Ao utilizarmos diversos agonistas serotonérgicos (**TABELA 4**), somente o 8-OH-DPAT, um agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e com atividade moderada no 5-HT<sub>7</sub>, foi capaz de gerar uma contração do CC de rato, ainda que com menor eficácia que aquela gerada pela 5-HT exógena. A concentração de 8-OH-DPAT que utilizamos foi elevada (100 µM) e, portanto ele perde a seletividade para 5-HT<sub>1A</sub>. Em termos de seletividade, no trabalho de Linder *et al.* (2010), a contração induzida por 8-OH-DPAT em veia jugular de rato foi abolida com o uso da ketanserina (30 nM), demonstrando que é possível que o 8-OH-DPAT atue também em receptores da família 5-HT<sub>2</sub>. Com esse exposto, fica claro que a resposta contrátil que observamos com o uso do 8-OH-DPAT pode não ser devido a uma ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, mas sim do 5-HT<sub>2</sub>. Além disso, tanto a buspirona, um agonista parcial 5-HT<sub>1A</sub>, quanto o CGS 12066B, agonista pleno 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub>, foram incapazes de induzir contração no CC de rato, sugerindo a não participação dessa família de receptores na contração do CC de rato. No entanto, nenhum dos demais agonistas utilizados, DOI, MK-212, BW 723C86, m-CPP, WAY 161503, que são seletivos para a família 5-HT<sub>2</sub> (para maiores detalhes visualizar o **QUADRO 2**), foram capazes de gerar alguma contração.

Já, ao analisar os resultados obtidos com o uso dos antagonistas serotonérgicos, observamos que tanto a ketanserina (**FIGURA 21; TABELA 5**) quanto o LY 266097 (**FIGURA 22; TABELA 6**) foram capazes de antagonizar a resposta contrátil gerada pelo estímulo com 5-HT em CC de rato.

A ketanserina é um antagonista dos receptores 5-HT<sub>2</sub>. Entretanto, ao acessar a base de dados de constantes de inibição (K<sub>i</sub>) do National Institute of Mental Health's Psychoactive Drug Screening Program (NIMH – PDSP), verifica-se que ela possui maior seletividade para o subtipo 5-HT<sub>2A</sub> (K<sub>i</sub> = 2,10 nM) e em menor escala para o 5-HT<sub>2C</sub> (K<sub>i</sub> = 59,19 nM); para o receptor 5-HT<sub>2B</sub>, apresenta um de k<sub>i</sub> de 3.498,10 nM. Este fármaco foi capaz de antagonizar a resposta contrátil induzida pela 5-HT na CCRC (**FIGURA 21**) na concentração de 10 nM e de abolir-la quando utilizado na concentração de 100 nM. Por ser capaz de antagonizar a resposta contrátil da 5-HT na concentração de 10 nM, sugerimos que há participação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> no processo contrátil, mas não do 5-HT<sub>2B</sub>. A participação do receptor 5-HT<sub>2C</sub> não pode ser excluída dado que a ketanserina também apresenta afinidade por esses

receptores na concentração eu utilizamos. A análise do pD2 e da contração máxima (**TABELA 5**) para o grupo que recebeu ketanserina na concentração de 10  $\eta$ M quando comparado ao controle, corrobora com o observado de que a ketanserina é eficaz em antagonizar a contração induzida pela 5-HT.

O composto LY 266097 que apresenta maior seletividade para o receptor 5-HT<sub>2B</sub> e, em menor escala, para os receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, também foi capaz de antagonizar a resposta contrátil gerada pela 5-HT em CC de ratos (**FIGURA 22; TABELA 6**). Os valores de Ki para esses compostos são, de acordo com o Cussac *et al.* (2002) e Audia *et al.* (1996), 0,20  $\eta$ M para o receptor 5-HT<sub>2B</sub>, 24,5  $\eta$ M para o receptor 5-HT<sub>2C</sub> e 19,49  $\eta$ M para o receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Com a concentração de 1  $\mu$ M observamos que o LY 266097 antagonizou parcialmente a resposta contrátil gerada pela 5-HT em CC de rato e aboliu a contração da 5-HT quando empregado na concentração de 10  $\mu$ M. Analisando esses resultados em conjunto com aqueles obtidos com o uso da ketanserina, parece provável que a atuação da 5-HT no CC de rato se dá por intermédio de receptores da família 5-HT<sub>2</sub>. Resultados semelhantes foram observados em CC de coelhos no trabalho de Furukawa *et al.* (2003), onde utilizaram como antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2</sub> a ketanserina e o LY 53857. Analisando mais detalhadamente os valores de Ki, verificamos que é improvável que o receptor 5-HT<sub>2B</sub> participe do processo contrátil, sendo os receptores 5-HT<sub>2C</sub>, e principalmente o 5-HT<sub>2C</sub>, os responsáveis.

Novamente descartamos a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> por meio do uso do WAY 100135 (**FIGURA 25; TABELA 9**), um antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Resultado esse que é contraditório ao que Furukawa *et al.* (2003) observaram em coelhos. Estes pesquisadores desenvolveram CCR para 5-HT na presença do antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, WAY 100635, e observaram que esse composto foi capaz de antagonizar a resposta contrátil frente à 5-HT à partir da concentração de 1  $\mu$ M. De acordo com Chemel *et al.* (2006), o WAY 100635 apresenta Ki de 2,2  $\eta$ M para os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, valores acima de 6.260,00  $\eta$ M para o receptor 5-HT<sub>2A</sub> e de mais de 10.000,00  $\eta$ M para o receptor 5-HT<sub>2C</sub>, ou seja, parece que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão participando do processo de contração do CC de coelhos. Lau *et al.* (2006) também observaram a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> na contração do CC de humanos com o uso do composto NAN-190 na concentração de 10  $\mu$ M. O NAN-190 apresenta valores de Ki de 1,3  $\eta$ M para o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 219  $\eta$ M para o 5-HT<sub>2A</sub> e 630  $\eta$ M para o 5-HT<sub>2C</sub>. Como a concentração do NAN-190 utilizada

pelos pesquisadores foi elevada, não é possível confirmar a participação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> em humanos, dado que ele, na concentração utilizada, pode estar antagonizando receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>.

A não participação de receptores 5-HT<sub>3</sub> no processo contrátil do CC de rato através do uso do antagonista zacopride (**FIGURA 24; TABELA 8**) vai de acordo com o observado em CC de coelhos (Furukawa *et al.*, 2003). Também não observamos a participação dos receptores 5-HT<sub>5</sub> e 5-HT<sub>7</sub> na contração do CC de rato quando os antagonistas GR 127935 e SB 269970 foram utilizados.

Em síntese, de acordo com nossos resultados sugerimos que a família de receptores 5-HT<sub>2</sub> está envolvida no processo de contração de CC de rato. Dentro desta família, provavelmente o 5-HT<sub>2A</sub> seja o de maior importância para o processo contrátil. Para confirmar essa hipótese, técnicas complementares devem ser realizadas, como o uso do PCR ou Western Blot.

### 5.3 A captação e o metabolismo da 5-HT na resposta contrátil

Fármacos como os ISRS podem alterar a função erétil. No entanto, utilizando a fluoxetina não observamos nenhuma alteração na resposta contrátil no CC de rato quando estimulado com 5-HT (**FIGURA 20; TABELA 3**). Estes fármacos tendem a impedir, ao menos parcialmente, a entrada de 5-HT na célula, elevando a concentração de 5-HT extracelular disponível para atuar nos seus receptores. Um deslocamento para a esquerda da CCRC seria esperado caso esse mecanismo se confirmasse, como é observado, por exemplo, em aorta de rato com o uso do ISRS fluvoxamina (Linder *et al.*, 2010). Apesar disso, os resultados de De Lima e Silva (2013), sugerem que a fluoxetina é incapaz de impedir a captação da 5-HT pelo CC de rato. No entanto, a fluoxetina também é um antagonista de receptores serotoninérgicos, com Ki de 42,6 nM para os receptores 5-HT<sub>2C</sub> e de 708 nM para o 5-HT<sub>2A</sub> (Pälvimäki *et al.*, 1996). Como a fluoxetina apresenta maior seletividade para o receptor 5-HT<sub>2C</sub> que para o 5-HT<sub>2A</sub>, e a concentração que utilizamos foi de 1 µM, podemos sugerir que os receptores 5-HT<sub>2C</sub> não participam da resposta contrátil induzida por 5-HT no CC de ratos.

Apesar de não observarmos nenhuma alteração na resposta contrátil com o uso de fluoxetina, é importante que outros ISRS, como a paroxetina, sejam utilizados antes de se afirmar que essa classe de medicamentos não altera a resposta contrátil frente a 5-HT em CC de ratos.

Além da ativação de seus receptores, a 5-HT pode ser captada e, dentro da célula, pode modular a contração do músculo liso por mecanismos como o de serotonilação (Watts *et al.*, 2009). Importante lembrar que a 5-HT após ser captada é rapidamente metabolizada pela MAO gerando como principal metabólito o 5-HIAA. Portanto, inibindo a MAO, maior quantidade de 5-HT estará disponível para exercer suas funções e menor serão os níveis de 5-HIAA formado. Utilizando tiras de CC incubadas com pargilina, um inibidor da MAO, De Lima e Silva (2013) observou um aumento na concentração de 5-HT e uma queda nos níveis de 5-HIAA quando comparado ao grupo controle (sem pargilina), comprovando a eficácia desse fármaco em inibir a metabolização da 5-HT em 5-HIAA. Apesar disso, não encontramos nenhuma diferença na resposta contrátil quando o CC foi incubado com pargilina comparado ao grupo controle (sem pargilina) (**FIGURAS 18 E 19; TABELA 2**), sugerindo que o aumento dos níveis intracelulares de 5-HT não é fundamental para a contração da musculatura lisa por intermédio da 5-HT exógena. Esse resultado mostra ainda que os metabólitos serotoninérgicos não participam da contração do CC de rato. No entanto, para avaliar com maior precisão o processo de serotonilação no CC, outros experimentos precisam ser desenvolvidos, como a verificação da presença e a atividade da enzima transglutaminase.

Em 1974, Toda *et al.* verificaram a capacidade deste metabólito da 5-HT em modular o tônus da musculatura lisa vascular e observaram que ele foi capaz de relaxar artérias cerebrais de cachorro. Sabendo que diversas moléculas, como a própria 5-HT podem gerar respostas antagônicas dependendo da estrutura em que se encontram, isto é, contração em um vaso e relaxamento em outro, decidimos avaliar a capacidade do 5-HIAA em contrair o CC de rato. Para tal, estimulamos o CC de rato com 5-HIAA exógena (100  $\mu$ M; dados não mostrados). A capacidade de relaxamento da musculatura lisa com o uso da 5-HIAA ainda precisa ser investigada.



## CONCLUSÃO

A partir dos nossos resultados podemos concluir através do EEC que o principal neurotransmissor envolvido no processo contrátil do CC de rato é a noradrenalina e que ela contrai o tecido através dos  $\alpha_1$ -adrenoreceptores. Demonstramos, ainda que de modo indireto, que provavelmente não há liberação, por parte dos neurônios intracavernosos de 5-HT. Apesar disso, verificamos que o CC de rato é capaz de contrair de modo concentração dependente quando estimulado com 5-HT exógena. Apesar de ser capaz de ser contraído na presença de 5-HT, essa resposta não é mantida quando estimulado várias vezes com essa substância, apresentando um perfil de resposta taquifilático. Dentro dos possíveis mecanismos de taquifilaxia, estudamos a participação das caveolas com o uso do composto M $\beta$ CD e observamos que elas não participam dessa perda de resposta.

Utilizando diversos agonistas e antagonistas serotoninérgicos, sugerimos que a família 5-HT<sub>2</sub> está diretamente envolvida no processo de contração do CC de rato. E, analisando mais detalhadamente os resultados obtidos com os antagonistas ketanserina e LY 266097, e também os da fluoxetina, infere-se que dentre os três membros dessa família (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>), o receptor 5-HT<sub>2A</sub> é provavelmente o de maior relevância no processo contrátil do CC de rato induzido por 5-HT, no entanto ainda é possível que ocorra participação, mas em menor grau, dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>.

Demonstramos também que a metabolização da 5-HT e que o seu principal metabólito, o 5-HIAA, não são importantes para a contração do CC de rato.

Sendo o sangue, através das plaquetas, um reservatório de 5-HT, sugerimos que a 5-HT desempenha o seguinte papel no processo de ereção peniana: ao ocorrer o relaxamento do CC e consequentemente a ereção peniana, há maior influxo e certa estase do sangue dentro dos sinusóides do CC. Essa permanência do sangue no CC pode permitir que haja liberação de 5-HT das plaquetas e ocorra uma interação da 5-HT com as células musculares que compõe o CC. A princípio essa interação geraria uma contração dessas estruturas, mas como há taquifilaxia, essa capacidade contrátil é perdida. O retorno venoso, que ocorre através da VDP, é impedido inicialmente pela veno-oclusão (compressão mecânica da veia), mas também acreditamos que a 5-HT liberada interaja com as células musculares deste vaso contraindo-o. Importante ressaltar que esse mecanismo de taquifilaxia não foi observado na VDP, ou seja, a contração da VDP é mantida pelo estímulo com 5-HT. Essa teoria vai de acordo com dados preliminares de nosso laboratório, onde foi verificado que a administração de 5-HT induz ereção espontânea em rato. Como a

5-HT é uma molécula incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, é provável que ela atue periféricamente, como na musculatura lisa do CC e da VDP, de modo a contribuir para a ereção peniana.



## REFERÊNCIAS

ABDO, C. H. N. et al. Disfunção erétil - resultados do estudo da vida sexual do brasileiro. **Rev. Assoc. Med. Brasil.**, v. 52, n. 6, p. 424-9, 2006.

AHLENIUS, S. et al. Mating behavior in the male rat treated with p-chlorophenylalanine methyl ester alone and in combination with pargyline. **Psychopharmacologia**, v. 20, n. 4, p. 383-388, 1971/12/01 1971.

ANDERSON, R. G. W. The caveolae membrane system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 199-225, 1998.

ANDERSSON, K.-E. Pharmacology of Penile Erection. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 417-450, September 1, 2001 2001.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 4, p. 811-859, December 1, 2011 2011.

ANDERSSON, K.-E.; STIEF, C. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. **World Journal of Urology**, v. 15, n. 1, p. 14-20, 1997/02/01 1997.

ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 191-236, January 1, 1995 1995.

AUDIA, J. E. et al. Potent, selective tetrahydro- $\beta$ -carboline antagonists of the serotonin 2B (5HT2B) contractile receptor in the rat stomach fundus. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 14, p. 2773-2780, 1996.

AWAD, A. et al. Evolution in the concept of erection anatomy. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 33, n. 4, p. 301-312, 2011/05/01 2011.

AYTAÇ; MCKINLAY; KRANE. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU International**, v. 84, n. 1, p. 50-56, 1999.

AZADZOI, K. M. et al. Effects of intracavernosal trazodone hydrochloride: animal and human studies. **J. Urol**, v. 144, n. 5, p. 1277-82, 1990.

BAKIRCIOGLU, M. E. et al. Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1 expression in the penile tissue of aged rats. **The Journal of urology**, v. 166, n. 2, p. 734-738, 2001.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 8// 1999.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, September 1, 2006 2006.

BENVINDO, O. D. et al. Relaxant effect and possible mechanism of 17-nor-subincanadine E in rabbit corpora cavernosa. **Asian J Androl.**, v. 13, n. 5, p. 747-753, 2011.

BERTRAND, P. P.; BERTRAND, R. L. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. **Autonomic Neuroscience**, v. 153, n. 1-2, p. 47-57, 2/16/2010.

BIVALACQUA, T. J. et al. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 12, p. 484-489, 12/1/2000.

BRIDDON, S. J.; LESLIE, R. A.; ELLIOTT, J. M. Comparative desensitization of the human 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors expressed in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **Br. J. Pharmacol.**, v. 125, n. 4, p. 727-734, 1998.

BROOKS, J. D. **Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia.** Campbell-Walsh Urol, 2007.

CHEMEL, B. et al. WAY-100635 is a potent dopamine D4 receptor agonist. **Psychopharmacology**, v. 188, n. 2, p. 244-251, 2006/10/01 2006.

COHEN, E. N. et al. The role of pH in the development of tachyphylaxis to local anesthetic agents. **Anesthesiology**, v. 29, n. 5, p. 994-1001, 1968.

CUSSAC, D. et al. Characterization of phospholipase C activity at h5-HT<sub>2C</sub> compared with h5-HT<sub>2B</sub> receptors: influence of novel ligands upon membrane-bound levels of [3H]phosphatidylinositols. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 365, n. 3, p. 242-252, 2002/03/01 2002.

DE LIMA E SILVA, A. K. **Abordagem farmacológica do papel da serotonina na função erétil de ratos.** 2013. (Mestrado em farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

DEAN, R. C.; LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urologic Clinics of North America**, v. 32, n. 4, p. 379-395, 11// 2005.

DIAZ JR, V. A.; CLOSE, J. D. Male sexual dysfunction. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 37, n. 3, p. 473-489, 9// 2010.

DOMENECH, T.; BELETA, J.; PALACIOS, J. M. Characterization of human serotonin 1D and 1B receptors using [3H]-GR-125743, a novel radiolabelled serotonin 5HT1D/1B receptor antagonist. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 356, n. 3, p. 328-34, 1997.

DONE, C. J.; SHARP, T. Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT1A and 5-HT2 receptors: microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 3-4, p. 411-421, 1994.

EARDLEY, I.; SETHIA, K. **Erectile dysfunction: current investigation and management. 2nd ed.** London: Mosby, 2003.

EL-METWALLY, M. A. et al. Involvement of alpha-receptors and potassium channels in the mechanism of action of sildenafil citrate. **International Journal of Impotence Research**, v. 19, p. 551-557, 2007.

ERSPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-Hydroxytryptamine. **Nature**, v. 169, n. 4306, p. 800-801, 05/10/print 1952.

FELDMAN, H. A. et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. **J Urol.**, v. 151, n. 1, p. 54-61, 1994.

FINBERG, J. P. M.; VARDI, Y. Inhibitory effect of 5-hydroxytryptamine on penile erectile function in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 698-702, 1990.

FRANCKEN, B. J. B. et al. The human 5-HT<sub>5A</sub> receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 361, n. 2-3, p. 299-309, 11/20/ 1998.

FURUKAWA, K. et al. Responses to serotonin (5HT) in isolated corpus cavernosum penis of rabbit. **Int J Impot Res**, v. 15, n. 4, p. 267-271, //print 2003.

GASTER, L. M. et al. The selective 5-HT<sub>1B</sub> receptor inverse agonist 1'-methyl-5-[[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]carbonyl]-2,3,6,7-tetrahydro- spiro[furo[2,3-f]indole-3,4'-piperidine] (SB-224289) potently blocks terminal 5-HT autoreceptor function both in vitro and in vivo. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1218-1235, 1998/04/01 1998.

GERSHON, M. D. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20 Suppl 7, p. 3-14, 2004.

GOREA, E.; ADRIEN, J. Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 285-291, 9/23/ 1988.



GOYAL, H. O. et al. Permanent induction of morphological abnormalities in the penis and penile skeletal muscles in adult rats treated neonatally with diethylstilbestrol or estradiol valerate: a dose-response study. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 32-43, 2005.

HAMBLIN, M. W.; METCALF, M. A. Primary structure and functional characterization of a human 5-HT<sub>1D</sub>-type serotonin receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 143-148, August 1, 1991 1991.

HEDLUND, P. et al. Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. **The Journal of Urology**, v. 164, n. 3, Part 1, p. 868-875, 9// 2000.

HELLEGOURACH, A. et al. Comparison of the contractile effects of an extract of Ginkgo biloba and some neurotransmitters on rabbit isolated vena cava. **Gen Pharmacol**, v. 16, n. 2, p. 192-32, 1985.

HOUNDOLO, T.; BOULAY, P.-L.; CLAING, A. G Protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5598-5604, February 18, 2005 2005.

HOYER, D. et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 157-203, June 1, 1994 1994.

HULL, E. M.; WOOD, R. I.; MCKENNA, K. E. **Neurobiology of male sexual behavior. Em: The Physiology of Reproduction**,. 3. Elsevier Press, 2006.

HURLEY, P. T. et al. Functional coupling of a recombinant Human 5-HT<sub>5A</sub> receptor to G-proteins in HEK-293 cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, n. 6, p. 1238-1244, 1998.

JAVED, M. A. Priapism associated with fluoxetine therapy: a case report. **Journal of Pakistan Medical Association**, p. 45-46, 1996.

JOHANNES, C. B. et al. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the massachusetts male aging study. **The Journal of Urology**, v. 163, n. 2, p. 460-463, 2// 2000.

JONKER, J. W.; SCHINKEL, A. H. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 1, p. 2-9, January 1, 2004 2004.

KIDD, M. et al. Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, n. 2, p. G260-G272, August 1, 2008 2008.

KIM, D. W. et al. Direct effect of carbon monoxide on relaxation induced by electrical field stimulation in rat corpus cavernosum. **Korean J Urol**, v. 51, n. 8, p. 572-578, 8/ 2010.

KNIGHT, A. et al. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 370, n. 2, p. 114-123, 2004/08/01 2004.

KORSTANJE, C. et al. Characterization of flufylline, fluprofylline, ritanserin, butanserin and R 56413 with respect to in-vivo  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- and 5-HT<sub>2</sub>-receptor antagonism and in-vitro affinity for  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- and 5-HT<sub>2</sub>-receptors: comparison with ketanserin. **J Pharm Pharmacol**, v. 38, n. 5, p. 374-9, 1986.

KOSHIMIZU, T.-A. et al. Recent advances in  $\alpha$ 1-adrenoceptor pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, n. 2, p. 235-244, 5// 2003.

KREGE, S. et al. Affinity of trazodone for human penile  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptors. **BJU International**, v. 85, n. 7, p. 959-961, 2000.

LAU, D. H. W. et al. Doxazosin and serotonin (5-HT) receptor (1A, 2A, and 4) antagonists inhibit 5-HT-mediated human cavernosal contraction. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 5, p. 679-685, 2006.

LEITOLIS, A. **Ingestão excessiva de sódio causa alterações na reatividade do corpo cavernoso *in vitro* e disfunção erétil em ratos**. 2013. (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

LIN, O. A. et al. The antidepressant 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists pizotifen and cyproheptadine inhibit serotonin-enhanced platelet function. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87026, 2014.

LINDER, A. E. et al. Serotonin receptors in rat jugular vein: presence and involvement in the contraction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 116-123, July 1, 2010 2010.

LINDER, A. E. et al. Penile erection requires association of soluble guanylyl cyclase with endothelial caveolin-1 in rat corpus cavernosum. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 5, p. R1302-R1308, 2006-04-07 17:34:22 2006.

LINDER, A. E. et al. Serotonin (5-HT) in veins: not all in vain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 2, p. 415-421, November 1, 2007 2007.

LINDER, A. E. et al. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin prevents angiotensin II-induced tachyphylactic contractile responses in rat aorta. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 1, p. 78-84, October 1, 2007 2007.

LÓPEZ-TUDANCA, P. L. et al. Synthesis and pharmacological characterization of a new benzoxazole derivative as a potent 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 2709-2714, 7/3/ 2003.

LOVELL, P. J. et al. A novel, potent, and selective 5-HT(7) antagonist: (R)-3-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl phenol (SB-269970). **J Med Chem**, v. 43, n. 3, p. 342-5, 2000.

LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375-414, September 1, 2000 2000.

LUE, T. F. Erectile dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 24, p. 1802-1813, 2000.

MARTEL, F.; MONTEIRO, R.; LEMOS, C. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human intestinal epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter (SERT). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 355-362, July 1, 2003 2003.

MCINTOSH, T. K.; BARFIELD, R. J. Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. I. Serotonin and the post-ejaculatory refractory period. **Behavioural Brain Research**, v. 12, n. 3, p. 255-265, 6// 1984.

MELIS, M. R.; ARGOLAS, A. Central control of penile erection: A re-visitation of the role of oxytocin and its interaction with dopamine and glutamic acid in male rats. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 939-955, 1// 2011.

MILLAN, M. J. et al. Novel benzodioxopiperazines acting as antagonists at postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors and as agonists at 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors: a comparative pharmacological characterization with proposed 5-HT<sub>1A</sub> antagonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 268, n. 1, p. 337-352, January 1, 1994 1994.

MILLAN, M. J. et al. Specific labelling of serotonin 5-HT<sub>1B</sub> receptors in rat frontal cortex with the novel, phenylpiperazine derivative, [<sup>3</sup>H]GR125,743: A pharmacological characterization. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 4, p. 589-598, 4// 2002.

MIZUSAWA, H. et al. Enhancement of apomorphine-induced penile erection in the rat by a selective  $\alpha 1D$ -adrenoceptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 701-708, 2002.

MODAI, I. et al. Serotonin uptake by blood platelets of acute schizophrenic patients. **Psychopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 193-195, 1979/01/01 1979.

MONTEJO-GONZÁLEZ, A. L. et al. SSRI-induced sexual dysfunction: fluoxetine, paroxetine, sertraline, and fluvoxamine in a prospective, multicenter, and descriptive clinical study of 344 patients. **J Sex Marital Ther**, v. 23, n. 3, p. 176-94, 1997.

MOREIRA JR, E. D. et al. Epidemiologia da disfunção erétil no Brasil: resultados da pesquisa nacional do Projeto Avaliar. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 61, p. 613-25, 2004.

NAGAKURA, Y. et al. Pharmacological properties of a novel gastrointestinal prokinetic benzamide selective for human 5-HT<sub>4</sub> receptor versus human 5-HT<sub>3</sub> receptor. **Pharmacological Research**, v. 39, n. 5, p. 375-382, 5// 1999.

NEWMAN-TANCREDI, A. et al. Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT<sub>1A</sub> receptors: a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding study. **European Journal of Pharmacology**, v. 355, n. 2-3, p. 245-256, 8/21/ 1998.

NI, W.; WATTS, S. W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 7, p. 575-583, 2006.

**NIMH PDSP: National Institute of Mental Health's Psychoactive Drug Screening Program** [internet]. disponível em: <http://pdsp.med.unc.edu/> Acessado em: Fevereiro, 2014.

NODA, M. et al. Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 2, p. 222-232, 2003.

O'CARROLL, A.-M. et al. The deamination of dopamine by human brain monoamine oxidase. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 322, n. 3, p. 198-202, 1983/09/01 1983.

PÄLVIMÄKI, E. P. et al. Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. **Psychopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 234-240, 1996/08/01 1996.

PIERCE, K. L.; LEFKOWITZ, R. J. Classical and new roles of  $\beta$ -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 727-733, 2001.

RACKÉ, K. et al. Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 83-87, 12/15/ 1995.

RAPPORT, M. M. Serum vasoconstrictor (serotonin); V The presence of creatinine in the complex: A proposed structure of the vasoconstrictor principle. **J Biol Chem**, v. 180, p. 961-969, 1949.

RENDU, F. et al. Smoking related diseases: the central role of monoamine oxidase. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 1, p. 136-147, 2011.

RODRIGUES, J. R.; REIS, J. M. **Impotência sexual: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Art Graph, 1993.

ROOSE, S. P. et al. Reversible loss of nocturnal penile tumescence during depression: a preliminary report. **Neuropsychobiology**, v. 8, n. 6, p. 284-8, 1982.

ROSEN, R. C.; MARIN, H. Prevalence of antidepressant-associated erectile dysfunction. **J Clin Psychiatry**, v. 64, n. 10, p. 5-10, 2003.

ROSENZWEIG-LIPSON, S. et al. Antiobesity-like effects of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist WAY-161503. **Brain Research**, v. 1073–1074, n. 0, p. 240-251, 2/16/ 2006.

SANDERS-BUSH, E. Adaptive regulation of central serotonin receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 3, p. 411-416. em BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 8// 1999. ISSN 0028-3908. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390899000106> >. , 1990. <

SCHÄFERMEYER, A. et al. Isolation and receptor profiling of ileal enterochromaffin cells. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, n. 1, p. 53-62, 2004.

SIMONSEN, U.; GARCÍA-SACRISTÁN, A.; PRIETO, D. Penile arteries and erection. **Journal of Vascular Research**, v. 39, n. 4, p. 283-303, 2002.

SLEIGHT, A. J. et al. Radiolabelling of the human 5-HT<sub>2A</sub> receptor with an agonist, a partial agonist and an antagonist: Effects on apparent agonist affinities. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 71-76, 1/12/ 1996.

SNEDDON, J. M. Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 680-688, 1969.

STEIGER, A.; HOLLSBOER, F.; BENKERT, O. Studies of nocturnal penile tumescence and sleep electroencephalogram in patients with major depression and in normal controls. **Acta Psychiatr Scand.**, v. 87, n. 5, p. 358-63, 1993.

STIEF, C.; NOACK, T.; ANDERSSON, K.-E. Signal transduction in cavernous smooth muscle. **World Journal of Urology**, v. 15, n. 1, p. 27-31, 1997/02/01 1997.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 8, p. 609-620, 08/print 2002.

SVENSSON, L.; HANSEN, S. Spinal monoaminergic modulation of masculine copulatory behavior in the rat. **Brain Research**, v. 302, n. 2, p. 315-321, 6/8/ 1984.

THOMAS, D. R. et al. Functional characterisation of the human cloned 5-HT<sub>7</sub> receptor (long form); antagonist profile of SB-258719. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, n. 6, p. 1300-1306, 1998.

THOMPSON, W. J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Pharmacology, biochemistry and function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 51, n. 1, p. 13-33, // 1991.

TODA, N. et al. Effects of 5-hydroxyindoleacetic acid on isolated canine cerebral arteries. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 642-644, 1974.

TOLL, L. et al. Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. **NIDA Res Monogr**, v. 178, p. 440-66, 1998.

TRAISH, A. M. et al. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function minireview. **Journal of Andrology**, v. 20, n. 6, p. 671-682, 1999.

TREVETHICK, M. A.; FENIUK, W.; HUMPHREY, P. P. 5-hydroxytryptamine-induced relaxation of neonatal porcine vena cava in vitro. **Life Sci**, v. 35, n. 5, p. 477-86, 1984.

TSUKAMOTO, K. et al. Luminally released serotonin stimulates colonic motility and accelerates colonic transit in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 1, p. R64-R69, 2007-07-03 23:14:18 2007.

WALTHER, D. J. et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**, v. 299, n. 5603, p. 76, January 3, 2003 2003.

WALTHER, D. J. et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet  $\pm$ -granule release. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 851-862, 2003.

WANG, H. et al. RhoA-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization in erectile function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30614-30621, August 23, 2002 2002.

WATTS, S. W. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? **Clin Sci (Lond)**, v. 108, n. 5, p. 399-412, 2005.

WATTS, S. W. et al. Serotonin and blood pressure regulation. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 359-388, April 1, 2012 2012.

WATTS, S. W.; PRIESTLEY, J. R. C.; THOMPSON, J. M. Serotonylation of vascular proteins important to contraction. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5682, 2009.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. S1, p. 2S-8S, 08/print 1999.

ZABLUDOWSKI, J. R.; BALL, S. G.; ROBERTSON, J. I. Ketanserin and alpha 1-adrenergic antagonism in humans. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 7, p. 123-5, 1985.